

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

Die *Knockdown*-vermittelte Kallikrein-8-Reduktion verbessert die Funktion der neurovaskulären Einheit im TgCRND8-Mausmodell der Alzheimer-Krankheit

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Luisa-Maria Scholz  
aus Duisburg  
2022

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. K. Keyvani  
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. O. Kastrup

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Januar 2023

Anteile dieser Dissertation sind in der unten aufgeführten Publikation enthalten:

Herring, A., Kurapati, N.K., Krebs, S., Grammon, N., **Scholz, L.M.**, Voss, G., Miah, M.R., Budny, V., Mairinger, F., Haase, K., *et al.* (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 47, 611-624.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Alzheimer-Krankheit: Epidemiologie und Klinik .....	8
1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und Geschlechtsunterschiede .....	8
1.3 Diagnostik und Therapie.....	9
1.4 Pathomechanismen .....	11
1.4.1 Beta-Amyloid-Pathologie (A $\beta$ ) .....	11
1.4.2 Tau-Pathologie.....	13
1.4.3 Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) und perivaskuläre Drainage.....	14
1.5 Neurovaskuläre Einheit.....	15
1.6 Transporter der Blut-Hirn-Schranke .....	17
1.6.1 <i>Multidrug Resistance Protein 1</i> (MDR1) .....	17
1.6.2 <i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1</i> (LRP1) .....	18
1.6.3 <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> (RAGE).....	19
1.7 Kallikrein-8 und Alzheimer-Krankheit.....	20
2 FRAGESTELLUNGEN.....	23
3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN .....	25
3.1 Allgemeines .....	25
3.2 Mausmodelle und Tierhaltung .....	25

3.2.1	Haltung der Mäuse .....	29
3.3	Verhaltensphänotypisierung .....	29
3.4	Probengewinnung .....	30
3.5	Quantifizierung der zerebralen Gefäßdichte .....	30
3.5.1	Vorarbeiten .....	30
3.5.2	Laminin-Immunhistochemie.....	31
3.5.3	Stereologische Quantifizierung Laminin gefärbter zerebraler Gefäße ..	32
3.6	Quantifizierung der zerebralen A $\beta$ -Transporter-Expression .....	32
3.6.1	Extraktion von DNA, RNA und Proteinen .....	32
3.6.2	Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
3.6.3	Fluoreszenz-Gelelektrophorese .....	36
3.6.4	Immunoblot (Western Blot).....	37
3.7	Statistik .....	45
3.8	Versuchsgenehmigung.....	46
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Auswirkung des <i>mKlk8-Knockdowns</i> auf die zerebrale Gefäßdichte .....	47
4.1.1	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht die Gefäßdichte im Hippokampus transgener weiblicher und männlicher Mäuse.....	47
4.1.2	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> zeigt keinen Einfluss auf die Gefäßdichte in Neokortex und Basalganglien transgener weiblicher und männlicher Mäuse .....	50
4.2	Auswirkungen des <i>mKlk8-Knockdowns</i> auf Transportproteine der Blut-Hirn-Schranke.....	52
4.2.1	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters MDR1 in transgenen Mäusen beider Geschlechter.....	52

4.2.2	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters LRP1 in weiblich-transgenen Mäusen .....	54
4.2.3	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> reduziert die Expression des A $\beta$ -Influxtransporters RAGE in weiblich-transgenen Mäusen.....	56
5	DISKUSSION.....	58
5.1	Reduktion exzessiv erhöhter Kallikrein-8-Spiegel verbessert die NVU-Dysfunktion .....	58
5.2	Potenzielle Mechanismen der Kallikrein-8-Reduktion-vermittelten Erfolge an der NVU.....	60
5.3	Kallikrein-8 als möglicher Initiator der Alzheimer-Pathologie.....	62
5.4	Die Kallikrein-8-Expression zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede im Rahmen der AD .....	65
5.5	Diagnostisches sowie therapeutisches Potenzial von Kallikrein-8.....	66
5.6	Einschränkungen, Stärken und Bedeutung der Arbeit.....	67
5.7	Schlussfolgerung.....	68
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7	SUMMARY .....	70
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	71
9	TABELLARISCHER ANHANG .....	81
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	81

9.2 Tabellenverzeichnis .....	81
10ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	82
11DANKSAGUNG.....	84
12LEBENS LAUF .....	85

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Alzheimer-Krankheit: Epidemiologie und Klinik

Die Alzheimer-Krankheit (Englisch: *Alzheimer's disease*, AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für Demenz im Erwachsenenalter. Betroffen sind 60-80% der 50 Millionen Demenzerkrankten weltweit (Kent et al., 2020). Aufgrund des demografischen Wandels (Nichols et al., 2019) wird bis 2050 eine Verdreifachung der Krankheitslast prognostiziert. Die ökonomische Belastung durch Demenzerkrankungen liegt aktuell bereits bei ca. 1 Billion US-Dollar jährlich (Alzheimer's Disease International, 2019). Dies lässt die zukünftige enorme sozioökonomische Belastung, durch drastisch steigende Fallzahlen bei mangelnden Therapiemöglichkeiten, erahnen (Kent et al., 2020; Tolar et al., 2020). Durch Zerstörung der Neurone präsentiert sich die AD klinisch mit einem umfangreichen Symptomkomplex in dessen Zentrum die progrediente Demenzentwicklung steht. Zu Beginn ist im Prodromalstadium (Englisch: *Mild Cognitive Impairment*, MCI) die Alltagskompetenz erhalten, doch der neuronale Untergang breitet sich aus, sodass im Laufe der Erkrankung die hinzukommenden motorischen Störungen zur Unfähigkeit im Alltag und kompletter Bettlägerigkeit führen (Alzheimer's Association, 2019; Jack et al., 2018). Die Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt im Mittel 4-8 Jahre; eine Zeit, die von zunehmender Pflegebedürftigkeit geprägt ist. Todesursachen sind häufig internistische Folgeerkrankungen, wie Aspirationspneumonien, aufgrund der motorischen Defizite (Alzheimer's Association, 2020).

## 1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und Geschlechtsunterschiede

Im Rahmen der AD lassen sich zwei Unterformen unterscheiden. Die frühe, oft familiär auftretende Form (Englisch: *Early-onset Alzheimer's disease*, EOAD), beginnt vor dem 65. Lebensjahr und zeigt bei gleicher Klinik eine schnellere Krankheitsprogression. Ursächlich für die, nur ca. 5% der Alzheimerfälle ausmachende, EOAD sind Mutationen in den Genen des *Amyloid Precursor Proteins*, *Presenilin-1* und *Presenilin-2* (*APP*, *PSEN1*

und *PSEN2*), welche die APP-Prozessierung beeinflussen. 95% der AD-Erkrankungen macht die späte Form (Englisch: *Late-onset Alzheimer's disease*, LOAD), mit einem Krankheitsbeginn ab dem 65. Lebensjahr, aus (Reitz and Mayeux, 2014; Selkoe and Hardy, 2016). Die LOAD entsteht multifaktoriell, wobei Alter, Genetik sowie familiäre Vorbelastung die Hauptrisikofaktoren darstellen. Zahlreiche modifizierbare Risikofaktoren wie geringe Bildung, mangelnde Bewegung oder kardiovaskuläre Risikofaktoren sind von großer Bedeutung (Alzheimer's Association, 2020). Neben dem genetischen Hauptrisikofaktor *Apolipoprotein E (APOE)*, besonders *APOE ε4* liegen auf Chromosom 19 weitere AD-assoziierte Gene, wie *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7 (ABCA7)* oder *Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 40 (TOMM40)* (Bao et al., 2016; Kunkle et al., 2019).

Von der AD sind besonders Frauen bedroht. Sie haben ein größeres Lebenszeitrisko für AD und machen 2/3 der Demenzbetroffenen weltweit aus (Nebel et al., 2018; Nichols et al., 2019). Bei gleichem neuropathologischem Befund zeigt sich bei Frauen eine stärkere Klinik sowie eine schnellere Krankheitsprogression. Die Gründe für diese Geschlechtsunterschiede sind noch nicht hinreichend geklärt, doch scheinen soziokulturelle und biologische Faktoren dafür verantwortlich zu sein. Obwohl das Sexualhormon Östrogen neuroprotektive Wirkung zeigt, bedeutet das Risikogen *APOE ε4* für Frauen ein deutlich höheres AD-Risiko als für Männer desselben Genotyps (Nebel et al., 2018).

### 1.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose der AD basiert auf klinischen Tests, Biomarkern und zerebraler Bildgebung (Deuschl et al., 2016), während die postmortale Untersuchung durch den Neuropathologen noch immer den Standard darstellt. Die etablierten Biomarker unterscheiden im Liquor und in der Bildgebung 3 verschiedene Kategorien: die Aβ-Pathologie, die Tau-Pathologie sowie Marker der Neurodegeneration (Hyman et al., 2012; Jack et al., 2018). Veränderungen der Biomarker markieren das präklinische Stadium der AD, einen Zeitraum, in dem noch keine klinischen Beeinträchtigungen auftreten und therapeutische Ansätze besonders vielversprechend scheinen (Sperling et al., 2011). Studien an Mutationsträgern familiärer Alzheimerformen

(*PSEN1*, *PSEN2*, *APP*) zeigen, dass pathologische Veränderungen bereits 20 Jahre vor klinischen Auffälligkeiten detektierbar sind (Gordon et al., 2018). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit früher Diagnoseparameter, um zukünftig bereits im frühen Stadium die Krankheit modulieren oder gar abwenden zu können.

Trotz der großen Bedeutung der AD und jahrzehntelanger intensiver Forschung stehen aktuell lediglich symptomorientierte krankheitsmodifizierende Therapien zur Verfügung (Carare et al., 2020; Kent et al., 2020). Evidenzbasiert zugelassen sind lediglich Acetylcholinesterase-Hemmer sowie NMDA-Antagonisten, deren Angriffspunkt die pathologisch veränderten Neurotransmitter-Spiegel sind (Deuschl et al., 2016; Howard et al., 2012). Ein Aufhalten oder gar Heilen der AD ist bisher unmöglich, weshalb dringend neue therapeutische Ansätze entwickelt werden müssen (Kent et al., 2020). Große Hoffnung bestand bei der Entwicklung der Immuntherapien, doch trotz intensiver Forschung zeigten sich keine überzeugenden klinischen Erfolge in den letzten Jahrzehnten (Honig et al., 2018; Novak et al., 2021; Tolar et al., 2020). Weder gegen A $\beta$ - noch gegen Tau gerichtete Immuntherapien zeigten bisher eine ausreichende Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten, obwohl monoklonale Antikörper (AK) die A $\beta$ -Last stark reduzieren konnten (Novak et al., 2021; Honig et al., 2018). Im Juni 2021 revolutionierte jedoch die beschleunigte Zulassung von Aducanumab die bislang erfolglose AD-Therapie-Forschung. Erstmalig ist damit eine krankheitsmodifizierende AD-Therapie verfügbar. Die Zulassung des monoklonalen A $\beta$ -Antikörpers ist jedoch eine der umstrittensten Entscheidungen der aktuellen medizinischen Forschung. Lediglich eine einzige Phase-III-Studie konnte klinische Verbesserungen nachweisen. Somit besteht weiterhin kein eindeutiger Nachweis der klinischen Effektivität der A $\beta$ -gerichteten Therapien, doch ca. 40% der Patient:innen leiden unter zerebralen Nebenwirkungen. Während die Zulassung für manche einen Durchbruch in der AD-Therapie verspricht, warnen Kritiker vor falscher Hoffnung für Betroffene sowie horrenden Ausgaben für ein ineffektives Therapiekonzept (Cavazzoni, 2021; Dunn et al., 2021; Walsh et al., 2021).

## 1.4 Pathomechanismen

Die typischen neuropathologischen Veränderungen der AD entstehen durch die Akkumulation verschiedener Proteine zu toxischen Aggregaten, genannt A $\beta$ - und Tau-Pathologie. In der Folge zeigt sich eine chronische Entzündungsreaktion sowie neuronale Schäden, Synapsenverlust, zerebrale Amyloidangiopathie oder Hirnatrophie (Hyman et al., 2012; Kent et al., 2020).

### 1.4.1 Beta-Amyloid-Pathologie (A $\beta$ )

Das mikroskopische Korrelat der AD bildet die A $\beta$ -Pathologie, bei der sich A $\beta$  extrazellulär zu Plaques zusammenlagert (Kent et al., 2020). A $\beta$  entsteht intrazellulär (in Vesikeln) (Walsh et al., 2002) aus dem Vorläuferprotein APP. Durch proteolytische Spaltung mittels  $\beta$ -Sekretase (Englisch: *Beta-Side Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1*, BACE1) und  $\gamma$ -Sekretase wird es zu den amyloiden Formen A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> umgewandelt (Kent et al., 2020; Selkoe and Hardy, 2016). Diese aggregieren schnell zu Di-, Tri- und Oligomeren, werden sezerniert (Walsh et al., 2002) und formen Fibrillen und  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Längere A $\beta$ -Ketten, wie A $\beta$ <sub>42</sub>, zeigen eine höhere Aggregationstendenz, welche bei Abfall des pHs noch verstärkt wird (Burdick et al., 1992; Kent et al., 2020). Physiologischer Weise wird vornehmlich das, als anti-Amyloid geltende, A $\beta$ <sub>40</sub> gebildet, doch im Rahmen der AD dominiert das aggregationsfreudigere A $\beta$ <sub>42</sub> (Kent et al., 2020; Selkoe and Hardy, 2016). Das in Plaques und Oligomeren akkumulierende A $\beta$  führt zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (Selkoe and Hardy, 2016), welche zur Verminderung von A $\beta$  beitragen sollen. Dieser protektive Mechanismus verselbstständigt sich durch die steigenden A $\beta$ -Level und es entsteht eine chronische Entzündungsreaktion. Der Entzündungsprozess richtet in der Folge selbst neuronale Schäden an (Huang et al., 2020) und verstärkt, durch einen sinkenden pH, die A $\beta$ -Aggregation (Burdick et al., 1992). Im Rahmen des Inflammationsgeschehens kommt es durch oxidativen Stress sowie Veränderungen des Mikromilieus zur veränderten Aktivität von Phosphatasen und Kinasen. Dies führt zu abnormer Phosphorylierung von Tau, woraus die Bildung von Neurofibrillären *Tangles* (NFTs) resultiert. Die Folgen dieser Kaskade sind, unter anderem, neuronale Dysfunktion

sowie Transmitterdefizite, welche zur Demenz vom Alzheimer-Typ führen können (Selkoe and Hardy, 2016). Diesem pathologischen Weg steht eine physiologische APP-Prozessierung entgegen, bei der mittels  $\alpha$ -Spaltung die Entstehung pathologisch aggregierenden A $\beta$ s verhindert wird. Im physiologischen Prozess entsteht A $\beta$  bei neuronaler Aktivität und ist unter anderem an der Regulation synaptischer Vorgänge sowie der Generierung der hippokampalen Langzeitpotenzierung (Englisch: *Long Term Potentiation*, LTP) beteiligt (Kent et al., 2020). Erkenntnisse dieser Amyloid-Hypothese basieren auf Forschung an Patient:innen mit Mutationen, welche die APP-Prozessierung beeinflussen, wie sie bei der EOAD vorliegen (Thomsen et al., 2017). Die relative Erhöhung von A $\beta$ <sub>42</sub> im Rahmen der EOAD entsteht unter anderem durch Mutationen im APP sowie der katalytischen Einheit der  $\gamma$ -Sekretase. Diese wird durch PSEN1 und PSEN2 gebildet. Die Mutationen führen zu veränderter „Prozessivität“ der  $\gamma$ -Sekretase, wodurch bevorzugt längere A $\beta$ -Ketten entstehen (Kent et al., 2020; Selkoe and Hardy, 2016; Sweeney et al., 2019). Demgegenüber steht der weitaus größere Anteil an Patient:innen mit LOAD, bei denen die Erkrankung sporadisch entsteht. Verschiedenste Faktoren führen bei der LOAD (Alzheimer's Association, 2020; Thomsen et al., 2017) zur verminderten A $\beta$ -Eliminierung (Englisch: *Clearance*) mit daraus resultierender Erhöhung von A $\beta$  (Selkoe and Hardy, 2016; Tarasoff-Conway et al., 2015). Die Reduktion von A $\beta$  wird durch zahlreiche Mechanismen vermittelt. Neben enzymatischem Abbau und Phagozytose leisten die zerebralen Gefäße einen wichtigen Beitrag, indem sie, durch direkten A $\beta$ -Transport über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) sowie entlang der Gefäßwände, eine Reduktion des zerebralen A $\beta$ s ermöglichen (Greenberg et al., 2020).

Es zeigt sich immer mehr, dass auch A $\beta$ -Oligomere für die toxische Wirkung des A $\beta$  verantwortlich sind und dabei genau gegenteilig zur physiologischen Funktion von A $\beta$  wirken (Kent et al., 2020; Shankar et al., 2008). Oligomere beeinträchtigen die synaptische Plastizität, indem sie die LTP verringern, die Dichte dendritischer Dornfortsätze reduzieren oder das murine Gedächtnis beeinträchtigen, während Plaques und Monomere diese schädliche Wirkung nicht hervorrufen (Selkoe and Hardy, 2016; Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002). In Patient:innen sind hohe Oligomer-Spiegel,

bei gleicher Plaque-Last, mit deutlich stärker beeinträchtigter Kognition verbunden (Selkoe and Hardy, 2016).

Nach der Amyloid-Hypothese stellt die A $\beta$ -Pathologie den Auslöser der AD dar. Da Plaques auch bei kognitiv unauffälligen Menschen nachweisbar sind, entsteht zunehmend Kritik an diesem Modell (Thomsen et al., 2017). Zudem zeigen die A $\beta$ -gerichteten Therapien nicht die gewünschten Erfolge, was die Theorie weiter auf den Prüfstand stellt (Honig et al., 2018; Huang et al., 2020).

#### **1.4.2 Tau-Pathologie**

Neben A $\beta$  ist die Tau-Pathologie essenziell für die AD-Diagnose, tritt aber erst nach dieser auf. Hierbei akkumuliert hyperphosphoryliertes Tau intrazellulär und bildet neurofibrilläre Bündel, die NFTs (Hyman et al., 2012; Selkoe and Hardy, 2016). Tau befindet sich physiologischer Weise als Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) im Axon der Neurone, wo es den axonalen Transport vermittelt und Mikrotubuli stabilisiert. Neben der Funktion an den Mikrotubuli scheint Tau auch über eine direkte Bindung an die DNA protektiv bei oxidativem Stress zu wirken und an der Transkription beteiligt zu sein (Kent et al., 2020). Durch ein verändertes Mikromilieu zeigen Phosphatasen und Kinasen bei der AD veränderte Aktivität, was zur abnormen Phosphorylierung von Tau beiträgt (Selkoe and Hardy, 2016). Das hyperphosphorylierte Tau aggregiert zu Oligomeren und Fibrillen und verliert seine physiologischen Funktionen. Verminderte Bindungskapazität an den Mikrotubuli führt zu deren Instabilität und kompromittiertem axonalen Transport (Alonso et al., 1994; Kent et al., 2020). Der entstehende Nährstoffmangel und Deprivation wichtiger Metabolite schädigt die Neurone weiter (Alzheimer's Association, 2019). Schädliche Aggregate des hyperphosphorylierten Taus sammeln sich in Soma und Dendriten und führen zur Degeneration der Neurone. Dabei zeigt sich eine Korrelation mit der klinischen Situation (Serrano-Pozo et al., 2011). Neben neuronalen Schäden vermittelt Tau (bei transgenen Mäusen) auch schädliche Einflüsse auf die zerebralen Gefäße. Hohe Tau-Spiegel am Gefäßendothel führen zu Mikroangiopathie, vermehrter Permeabilität der BHS und höherer Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (Bennett et al., 2020).

### 1.4.3 Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) und perivaskuläre Drainage

80% der Alzheimerfälle gehen mit einer zerebralen Amyloidangiopathie (Englisch: *Cerebral Amyloid Angiopathy*, CAA) einher (Thomsen et al., 2017). Ein gemeinsamer Pathomechanismus von AD und CAA ist die zerebrovaskuläre Dysfunktion, welche eine zunehmende Bedeutung in der Pathogenese kognitiver Beeinträchtigungen im Alter gewinnt (Greenberg et al., 2020). Ursächlich hierfür ist bei der CAA die Ablagerung von A $\beta$  in den zerebralen Gefäßwänden. Dieses akkumuliert in den Basalmembranen von Kapillaren sowie glatten Muskelzellen der arteriellen Tunica media, verändert deren Proteinzusammensetzung und führt zu deren Verdickung. Die veränderte vaskuläre Integrität durch A $\beta$ -Ablagerungen erhöht die Rigidität der Gefäßwand und beeinträchtigt die Blutversorgung. Durch Hämorrhagien oder auch ischämische Ereignisse trägt die CAA zur Neurodegeneration bei (Greenberg et al., 2020; Thomsen et al., 2017). Die Bedeutung der Gefäßaffektion für die AD-Patient:innen zeigt sich in einer deutlich schnelleren und stärkeren Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten bei Patient:innen mit begleitender CAA (Greenberg et al., 2020). Die vaskulären Schäden der CAA zeigen sich, besonders in frühen Stadien, gravierender bei weiblichen Mäusen (Keyvani et al., 2018). Während bei der Plaque-Pathologie A $\beta$ <sub>42</sub> dominiert, lagert sich in den Gefäßwänden im Rahmen der CAA vornehmlich A $\beta$ <sub>40</sub> ab. Die Ablagerungen in den Basalmembranen befinden sich entlang eines zerebralen Drainagesystems, der intramuralen periarteriellen Drainage (IPAD) (Greenberg et al., 2020). Entlang dieser Basalmembranen kann im Extrazellularraum befindliches A $\beta$  abfließen und somit die zerebrale A $\beta$ -Last reduziert werden (Morris et al., 2016). Darüber hinaus unterstützen die Gefäßwände die zerebrale *Clearance* über das glymphatische System. Hierbei drainiert Liquor, Aquaporin-4-vermittelt (AQP4), von arteriellen Basalmembranen über das zerebrale Interstitium in venöse Gefäßwände, um das Gehirn von löslichen Substanzen zu befreien (Morris et al., 2016; Sweeney et al., 2019; Tarasoff-Conway et al., 2015). Somit tragen die Gefäße zur A $\beta$ -*Clearance* bei, doch Alter, *APOE*  $\epsilon$ 4-Genotyp oder hohe A $\beta$ -Last kompromittieren diese protektiven Mechanismen, was die CAA verstärkt (Carare et al., 2020). Durch Beeinträchtigung der perivaskulären Drainage verstärkt die CAA die AD (Greenberg et al., 2020) und stellt die Hauptursache für Gefäßschäden sowie lobäre Blutungen im Rahmen der AD dar (Sweeney et al., 2018b).

## 1.5 Neurovaskuläre Einheit

Die zerebrale Gesundheit ist von einer adäquaten vaskulären Funktion abhängig. Dies spiegelt sich in dem hohen Sauerstoff- und Glukoseverbrauch von 20% des Gesamtangebots und einer Gefäßlänge von ca. 664km im Gehirn wider. Durch eine enge funktionelle Verknüpfung in der neurovaskulären Einheit (Englisch: *Neurovascular Unit*, NVU) kann die Blutversorgung an die Aktivität angepasst werden, was als funktionelle Hyperämie oder neurovaskuläre Kopplung bezeichnet wird. Die NVU setzt sich aus dem Endothel, Tonus regulierenden Zellen wie Perizyten und glatten Muskelzellen, den Fußfortsetzen der Astrozyten sowie Neuronen zusammen (Sweeney et al., 2018a; Sweeney et al., 2018b). Neben gefäßassoziierten Prozessen, wie Angiogenese und BHS-Permeabilität, moderiert die NVU auch Zell-Matrix-Interaktionen sowie die Neurogenese. Innerhalb der NVU befindet sich das einschichtige Gefäßendothel der BHS. Zahlreiche Zellkontakte, besonders *Tight Junctions*, schaffen eine dichte Barriere mit geringer Permeabilität, wodurch ein besonderes Mikromilieu im Gehirn geschaffen wird. Dieses feinabgestimmte Mikromilieu ist für synaptische Prozesse und neuronale Interaktionen elementar. Bei inflammatorischen Prozessen oder neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD, kommt es zum Untergang von *Tight Junction*-Proteinen (Sweeney et al., 2019) und Perizyten, wodurch sich die BHS-Permeabilität erhöht, toxische Stoffe im Gehirn akkumulieren und zu Neurodegeneration führen können (Sweeney et al., 2018b).

Veränderungen der BHS zeigen sich auch im physiologischen Alterungsprozess. Bei MCI- und AD-Patient:innen sind sie jedoch weitaus stärker ausgeprägt und gehen mit deutlich schnellerer Krankheitsprogression und schlechterer Kognition einher. Dieser BHS-Zusammenbruch tritt bei Mäusen bereits vor der A $\beta$ -Pathologie oder kognitiven Einschränkungen auf und auch bei MCI-Patient:innen zeigen MRT-Aufnahmen Dysfunktionen der BHS vor dem Auftreten einer manifesten Demenz (Sweeney et al., 2018a; Sweeney et al., 2019). Dies geht mit reduzierter zerebraler Kapillarlänge- und Dichte einher (Sweeney et al., 2018b). Auch die neurovaskulären Schäden im Rahmen der AD zeigen eine Geschlechterdominanz mit stärkerer Belastung weiblicher Mäuse (Keyvani et al., 2018).

Neben der direkten Schädigung der NVU beeinträchtigt die AD, über A $\beta$ , den zerebralen Blutfluss (Deane et al., 2003) sowie die funktionelle Hyperämie, vor Auftreten der A $\beta$ -

und Tau-Pathologie. Damit ist die vaskuläre Dysfunktion ein sehr frühes Ereignis in der Pathogenese der AD (Sweeney et al., 2018a).

A $\beta$ -Oligomere sind nicht nur besonders neurotoxisch, sondern zeigen auch bei Zellen der BHS die höchste Toxizität. A $\beta$ -vermittelt kommt es zu vermehrter Enzymaktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP9 und MMP2), welche über die Aktivierung des CypA-NF- $\kappa$ B-MMP9-Weges (CypA: Abkürzung für Cyclophilin A, NF- $\kappa$ B: Abkürzung für *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-cells*) für die pathologische Abnahme von *Tight Junction*-Proteinen und Kollagen mitverantwortlich sind. Damit spielen A $\beta$ -Oligomere eine zentrale Rolle in der Schädigung der BHS (Jia et al., 2020; Nikolakopoulou et al., 2021; Wan et al., 2015).

Der Ephrinrezeptor B2 (EPHB2) ist wichtig für die Integrität der NVU, indem er im Rahmen der Angiogenese die Rekrutierung glatter Muskelzellen vermittelt (Sweeney et al., 2018a). Bei der AD zeigen sich die EPHB2-Spiegel reduziert (Herring et al., 2016), was über mangelnde zelluläre Integrität zum Stabilitätsverlust und zum Zusammenbruch der BHS führt (Sweeney et al., 2018a).

Die gestörte Eliminierung von A $\beta$  ist der treibende Faktor bei der weit verbreiteten LOAD (Reitz and Mayeux, 2014; Selkoe and Hardy, 2016; Tarasoff-Conway et al., 2015). Neben der direkten A $\beta$ -Degradation (mittels Phagozytose sowie enzymatischem Abbau) spielen die zerebralen Gefäße eine zentrale Rolle bei der A $\beta$ -*Clearance*, da sie über gleich zwei verschiedenen Mechanismen das zerebrale A $\beta$  reduzieren (Carare et al., 2020; Greenberg et al., 2020). Während die perivaskuläre Drainage nur ca. 15% der vaskulären A $\beta$ -Eliminierung vermittelt, wird der Großteil mit ca. 85% schnell und konzentrationsabhängig über die BHS transportiert (Shibata et al., 2000; Sweeney et al., 2018b). Durch hohe A $\beta$ -Spiegel im Rahmen der AD wird die Transportkapazität überstiegen und A $\beta$  akkumuliert im Gehirn (Shibata et al., 2000). Darüber hinaus verändert die AD die Expression der Transportproteine der BHS. Es kommt zu einer Reduktion der A $\beta$ -Effluxtransporter bei gleichzeitiger Zunahme der Influxtransporter. Auf diese Weise ist der Haupteliminationsweg von A $\beta$  über die BHS beeinträchtigt und durch zerebrale Akkumulation wird die neurodegenerative A $\beta$ -Pathologie gefördert (Sweeney et al., 2018b).

## 1.6 Transporter der Blut-Hirn-Schranke

Die BHS können nur wenige Moleküle passieren, weshalb *Carrier* und Transporter die Passage erleichtern (Sweeney et al., 2018b). Es wird zwischen Aufnahmetransportern (Influxtransporter), wie dem *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) und Effluxtransportern, wie dem *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) oder *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1* (LRP1), unterschieden (Deane et al., 2004; Deane et al., 2012; Jia et al., 2020; Lam et al., 2001). Besonders Effluxtransporter stellen einen Abwehrmechanismus dar, indem sie toxische Stoffe aus dem Gehirn ins Blut transportieren und darüber schädliche Effektoren eliminieren. Eine veränderte Expression der Transportproteine der BHS trägt zur Entstehung von ZNS-Erkrankungen, wie der AD, bei (Jia et al., 2020).

### 1.6.1 *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1)

Der Effluxtransporter MDR1 ist am Abtransport von A $\beta$  über die BHS beteiligt (Lam et al., 2001; Sweeney et al., 2019). Neben der zerebralen Expression am Gefäßendothel, in Perizyten, Neuronen, Astrozyten oder am Plexus choroideus, wird MDR1 auch in zahlreichen exkretorischen Organen, wie Leber, Niere oder Hoden, ausgeprägt (Cordon-Cardo et al., 1989; Jia et al., 2020; Thiebaut et al., 1987). Der vornehmlich luminal befindliche Transporter vermittelt den A $\beta$ -Transport Adenosintriphosphat-abhängig (ATP) über direkte Interaktion mit A $\beta$  (Lam et al., 2001; Sweeney et al., 2019).

Beeinträchtigt wird die zerebrale *Clearance*-Funktion durch Abnahme der MDR1-Dichte im physiologischen Alterungsprozess. Somit wirkt Alter als Risikofaktor für die AD mit besonderer Beeinträchtigung der gefäßvermittelten A $\beta$ -Reduktion (Jia et al., 2020).

Die Bedeutung von MDR1 für die A $\beta$ -Eliminierung zeigt sich in einer negativen Korrelation von A $\beta$ -Akkumulation und Höhe der MDR1-Expression (Vogelgesang et al., 2004). Bereits in frühen Stadien der AD kann in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine reduzierte MDR1-Aktivität an der BHS nachgewiesen werden (Sweeney et al., 2019). Ursächlich sind unter anderem der vermehrte Anfall von A $\beta$  sowie inflammatorischer Zytokine, welche die MDR1-

Expression (auf mRNA- und Proteinebene) reduzieren (Jia et al., 2020). Somit stellt die AD gleich zweifach ein Risiko für verminderte MDR1-Aktivität und damit Verstärkung der A $\beta$ -Akkumulation dar (Sweeney et al., 2018b).

### **1.6.2 *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1)***

Beinahe die Hälfte des BHS-Transportes wird über den Effluxtransporter LRP1 vermittelt (Storck et al., 2016). Als Mitglied der „*Low Density Lipoprotein Receptor-Familie*“ gehört LRP1 zu den APOE-Rezeptoren und wird viel in Leber und Gehirn exprimiert (Herz et al., 1988; Sweeney et al., 2019). Neben der Expression in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia (Storck et al., 2016) befindet sich LRP1 an der abluminalen Seite der BHS, wo es die Endozytose von A $\beta$  vermittelt (Sweeney et al., 2019). Der Transport von A $\beta$  erfolgt über direkte Interaktion mit LRP1, doch ist die Affinität für A $\beta$ <sub>40</sub> weitaus höher als für A $\beta$ <sub>42</sub>. Die Konsequenz ist ein deutlich langsamerer Transport von A $\beta$ <sub>42</sub>, welcher bei steigenden A $\beta$ <sub>40</sub>-Spiegeln (durch den kompetitiven Antagonismus) noch weiter kompromittiert wird (Deane et al., 2004) und somit die pathologische Akkumulation von A $\beta$ <sub>42</sub> bei der AD fördert. Dass LRP1 einer der Haupteffektoren zur Reduktion zerebralen A $\beta$ s ist, zeigt die um ca. 50% reduzierte A $\beta$ <sub>42</sub>-*Clearance* über die BHS bei LRP1-Mangel (im Mausmodell). Die Folge sind bis zu 4,8-fach erhöhte Spiegel löslichen A $\beta$ s. Da der Anteil des LRP1-vermittelten A $\beta$ -Transports mit höheren A $\beta$ -Spiegeln noch weiter zunimmt, ist LRP1 von ganz besonderer Bedeutung in der Pathogenese der AD (Storck et al., 2016). Ursächlich für verminderte LRP1-Spiegel bei der AD sind unter anderem eine, durch oxidativen Stress vermittelte Fehlfaltung von LRP1, welche in vermehrtem Abbau im Proteasomen resultiert und durch hohe A $\beta$ -Level getriggert wird (Deane et al., 2004; Sweeney et al., 2019). Darüber hinaus geht der LRP1-Mangel mit einer Schädigung der BHS einher. Die Interaktion von APOE mit LRP1 auf Perizyten vermittelt Isoform abhängig die Aufrechterhaltung der BHS-Integrität. Über Hemmung des CypA-MMP-9-Signalwegs verhindern APOE2 und APOE3, durch Bindung an LRP1, den Abbau von BHS Komponenten. APOE4 hingegen zeigt keine ausreichende Affinität zu LRP1, womit es zu einer Enthemmung des BHS-Abbaus mit Mikroblutungen und

nachfolgend neuronalen Schäden kommt (Nikolakopoulou et al., 2021; Sweeney et al., 2019). Neben vaskulären Schäden beeinflusst APOE auch die A $\beta$ -Clearance. A $\beta$  allein wird vornehmlich über den schnellen LRP1-Transportweg aus dem Gehirn transportiert, doch der Komplex mit APOE, besonders APOE4, führt zu einem vermehrten Transfer über den weitaus langsamer agierenden *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor* (VLDLR). Die Folge ist eine, um den Faktor 15, verminderte Clearance (Deane et al., 2008). Nicht zuletzt wirkt sich ein LRP1-Mangel auch negativ auf die kognitive Funktion im Tiermodell aus und besitzt damit klinische Relevanz (Storck et al., 2016). Dies unterstreicht die wichtige Funktion von LRP1 in der AD-Pathogenese und bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität, als Voraussetzung für eine adäquate Clearance.

### **1.6.3 Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)**

Der Multiliganden-Rezeptor *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) gehört zur „Immunglobulin-Superfamilie“ (Neeper et al., 1992) und vermittelt einen großen Teil des Influxes von löslichem A $\beta$  an der BHS (Deane et al., 2012; Sweeney et al., 2018b). RAGE wird von zahlreichen Zellen, wie glatten Muskelzellen oder Immunzellen, sowie am luminalen Endothel zerebraler Gefäße exprimiert (Deane et al., 2012; Paudel et al., 2020). Über Bindung von *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) ist RAGE an der proinflammatorischen Modulation des angeborenen Immunsystems beteiligt. Während die Effluxtransporter der AD entgegenwirken, fördert die RAGE-Aktivierung die pathologischen Prozesse über Verstärkung der A $\beta$ - und Tau-Pathologie (Paudel et al., 2020). Die Aktivierung von RAGE erhöht die Aktivität der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase und fördert so die Generation toxischen A $\beta$ s (Burstein et al., 2018; Paudel et al., 2020). Auch direkte neuronale Schäden mit synaptischer Dysfunktion und Abnahme der Acetylcholinesterase-Aktivität werden durch RAGE-Aktivierung vermittelt (Paudel et al., 2020). Gleichzeitig wird über RAGE eine Entzündungsreaktion initiiert. Zum einen wirkt der zerebrale Influx von A $\beta$  selbst entzündungsfördernd und zum anderen werden vermehrt proinflammatorische Mediatoren, wie NF- $\kappa$ B, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), oder Interleukin-6 (IL-6) gebildet, Mikroglia aktiviert und der oxidative Stress erhöht. So

kommt es zur verstärkten A $\beta$ -Akkumulation und Aggregation mit neuronalen Schäden (Burdick et al., 1992; Burstein et al., 2018; Deane et al., 2012). Zudem wird die neurovaskuläre Integrität durch die Interaktion von RAGE mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren stark beeinträchtigt. Vermehrte Leckagen, Abnahme der *Tight Junction*-Proteine sowie verstärkte Aktivität von MMP2 und MMP9 sind die Folge und führen zum Abbau der BHS (Deane et al., 2012; Wan et al., 2015). Auch der zerebrale Blutfluss ist vermindert und durch Reduktion des Glukosemetabolismus wird die neuronale Nährstoffversorgung noch weiter eingeschränkt (Burstein et al., 2018). A $\beta$ , besonders A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere (Wan et al., 2015), führen zu erhöhter RAGE-Expression, weshalb bei AD-Patient:innen die RAGE-Level bereits früh im Krankheitsprozess erhöht sind. Die elevierten RAGE-Level verstärken die A $\beta$ -vermittelten Schäden an Neuronen und haben, durch verminderte kognitive Fähigkeiten, auch eine klinische Relevanz (im Tiermodell) (Paudel et al., 2020).

## 1.7 Kallikrein-8 und Alzheimer-Krankheit

Der erste Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Kallikrein-System und der AD zeigte sich bereits vor fast 20 Jahren durch den Nachweis stark erhöhter Kallikrein-8-mRNA Level (*KLK8*) im Hippokampus von AD-Patient:innen (Shimizu-Okabe et al., 2001). *KLK8* ist eine von 15 Serin-Proteasen der Kallikrein-Familie (Prassas et al., 2015), welche neben dem Gehirn in zahlreichen weiteren Geweben, wie Brust, Haut oder Tonsillen, exprimiert wird (Shaw and Diamandis, 2007; Shimizu-Okabe et al., 2001). Eine hohe zerebrale *KLK8*-Expression zeigt sich physiologischer Weise besonders in Regionen, welche für Lern- und Gedächtnisprozesse wichtig sind, wie Hippokampus, Amygdala (Prassas et al., 2015) oder auch Kortex (Konar and Thakur, 2015). *KLK8* wird als inaktives Zymogen sezerniert, über Proteolyse aktiviert und im Gewebe durch verschiedenste Mechanismen in seiner katalytischen Aktivität moduliert. Stress steigert die zerebrale *KLK8*-Expression doch erfolgt die Aktivierung oft erst bei synaptischer Aktivität. Über Spaltung verschiedenster Substrate wie EPHB2, Neuregulin-1 (NRG1) oder des Zell Adhäsionsmoleküls L1CAM (Englisch: *Neuronal Cell Adhesion Molecule L1*), ist *KLK8* an zahlreichen zerebralen Signalkaskaden beteiligt. Neben Modulation synaptischer Plastizität vermittelt *KLK8* die

Entstehung von Angst, Angiogenese oder Phagozytose (Herring et al., 2016; Prassas et al., 2015; Tamura et al., 2012; Xing et al., 2019). Über die Beteiligung von KLK8 bei Erkrankungen wie Psoriasis, Schizophrenie oder Angsterkrankungen ist bereits vieles bekannt, doch die Rolle von KLK8 bei der AD ist bisher kaum erforscht (Herring et al., 2016; Prassas et al., 2015).

Unsere Arbeitsgruppe konnte als Erste eine Beteiligung von KLK8 an den pathologischen Prozessen der AD zeigen. Im Gehirn sind KLK8-Level bei AD-Erkrankten (Mensch und Mausmodell) bereits vor Auftreten klinischer oder neuropathologischer Auffälligkeiten massiv erhöht und steigen im Krankheitsverlauf weiter an (Herring et al., 2016). Der Erhöhung von KLK8 folgt ein Abfall des KLK8-Spaltprodukts *full-length-EPHB2* (EPHB2-FL) bei AD-Patient:innen sowie im Mausmodell (Attwood et al., 2011; Herring et al., 2016). Besonders Frauen sind von der AD betroffen (Nebel et al., 2018; Nichols et al., 2019) und KLK8 spiegelt diese Geschlechtsunterschiede, sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen, wider. Bei Frauen konnten höhere KLK8-Level, assoziiert mit stärkerer kognitiver Beeinträchtigung, bei gesunden sowie bei AD-erkrankten Frauen nachgewiesen werden. Ursächlich scheint eine Östrogen-induzierte KLK8-Synthese zu sein (Keyvani et al., 2018). Eine vierwöchige KLK8-Reduktion mittels AK-Applikation konnte im Mausmodell vielfach neuropathologische und klinische Verbesserungen erzielen. Durch verminderte APP-Prozessierung und geringere A $\beta$ <sub>42</sub>-Generierung, bei erhöhter A $\beta$ -*Clearance* über die BHS und verstärkter mikroglialer Phagozytose, konnte die A $\beta$ -Plaquelast reduziert werden. Da sich besonders das Volumen der jüngeren Plaques reduzierte, wurde eine Beteiligung von KLK8 an den frühen Prozessen der AD-Pathologie vermutet. Darüber hinaus induzierte die KLK8-AK-Therapie die strukturelle Neuroplastizität, während die Tau-Pathologie reduziert wurde. Eine Erhöhung der zerebralen Gefäßdichte im Frontalkortex und in den Basalganglien nicht-transgener Mäuse sowie die Zunahme der *Clearance* von A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> über die BHS transgener Mäuse bestätigten eine Verbesserung der neurovaskulären Funktion durch die KLK8-AK-Therapie. Neben der Erhöhung der Blutgefäßdichte zeigte sich auch eine Zunahme der Effluxtransporter (MDR1 und LRP1) an der BHS, welche zur Verbesserung der *Clearance* beitragen. Dem gegenüber stand eine erhöhte Expression des Influxtransporters RAGE in nicht-transgenen Mäusen. Mit Verbesserung der Gedächtnisleistung und Ängstlichkeit zeigte die AK-Therapie auch eine klinische

Verbesserung, während kaum negative Effekte auf gesunde (nicht-transgene) Mäuse beobachtet werden konnten (Herring et al., 2016).

Aufgrund dieser breitgefächerten Verbesserungen der AD-Pathologie könnte die KLK8-gerichtete Therapie eine vielversprechende neue Therapieoption in der bisher aussichtslosen Therapiestrategie der AD sein (Herring et al., 2016).

Die Hypothese, dass KLK8 an der Pathogenese der AD beteiligt ist, unterstützen auch genetische Erkenntnisse. Wie viele AD-Risikogene (*APOE*, *ABCA7*, *TOMM40*) liegt auch *KLK8* auf Chromosom 19 (Bao et al., 2016; Kunkle et al., 2019; Prassas et al., 2015), womit es zu einem potenziellen AD-Risikogen gehören könnte.

Neben seinem therapeutischen Potenzial stellt KLK8 einen Biomarker mit vielversprechender diagnostischer Sicherheit dar. Sowohl im Liquor als auch im Blut lässt er sich nachweisen und zeigt zur Detektion früher AD-Stadien, wie der MCI, eine höhere diagnostische Sicherheit als etablierte Biomarker. Damit könnte KLK8 ein Biomarker mit großem Potenzial in der wichtigen frühen AD-Phase sein (Teuber-Hanselmann et al., 2020). Aufgrund der langen präklinischen Pathogenese der AD (Gordon et al., 2018) ist die Suche nach verlässlichen Frühmarkern von besonderer Bedeutung, da Therapieansätze in diesem Zeitraum als sehr erfolgreich angesehen werden (Huang et al., 2020). Damit steigt die Relevanz von KLK8 im Rahmen der AD, weil es sowohl diagnostisches als auch therapeutisches Potenzial besitzt (Herring et al., 2016; Teuber-Hanselmann et al., 2020).

## 2 FRAGESTELLUNGEN

Eine vierwöchige Antikörper-vermittelte KLK8-Blockade zeigte, wie bereits beschrieben, weitreichende klinische und molekulare Verbesserung multipler AD-assoziiierter Pathologien. Darunter auch eine Modulation und Verbesserung der, bei der AD kompromittierten, protektiven Funktion der NVU, was KLK8 zu einem vielversprechenden therapeutischen *Target* macht.

Bisher unbekannt sind jedoch langfristige Auswirkungen einer KLK8-Reduktion bei der AD auf die neurovaskuläre Einheit sowie die Untersuchung auf Geschlechtsunterschiede in diesem Zusammenhang.

Im Rahmen eines umfangreichen Projekts wurden zahlreiche Effekte eines *mKlk8-Knockdowns* auf die AD-Pathologie untersucht. Durch den genetischen Ansatz sollte die Wirkung langfristig reduzierter KLK8-Spiegel auf die Mäuse ermittelt sowie eine Wiederholbarkeit der, durch die KLK8-Antikörper-Blockade vermittelten Erfolge aus der vorherigen Arbeit überprüft werden. Zudem diene dieser Ansatz dazu unentdeckte Interaktionen des KLK8-Antikörpers zu umgehen und die Effekte somit nur auf die KLK8-Spiegel zurückführbar zu machen. Vor diesem Hintergrund ergeben sich folgende Fragestellungen meiner Dissertation:

1. Welchen Einfluss hat eine langfristige KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die AD-pathologischen Veränderungen der zerebralen Gefäßdichte bei weiblichen und männlichen Mäusen in Hippokampus, Neokortex und den Basalganglien?
2. Welchen Einfluss hat eine langfristige KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die AD-pathologischen Veränderungen der zerebralen Expression des Effluxtransporters MDR1 bei weiblichen und männlichen Mäusen im Neokortex?

3. Welchen Einfluss hat eine langfristige KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die AD-pathologischen Veränderungen der zerebralen Expression des Effluxtransporters LRP1 bei weiblichen und männlichen Mäusen im Neokortex?
  
4. Welchen Einfluss hat eine langfristige KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die AD-pathologischen Veränderungen der zerebralen Expression des Influxtransporters RAGE bei weiblichen und männlichen Mäusen im Neokortex?

### 3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Allgemeines

Die Arbeitsschritte 3.2 bis 3.6 sowie 3.8.1 und 3.8.2 wurden von anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt und waren kein direkter Bestandteil meiner experimentellen Dissertation, bildeten jedoch die Grundlage für meine Laborarbeit. Meine Tätigkeit umfasste die eigenständige Probenvorbereitung und Herstellung der Polyacrylamidgele (3.7.1), Gelelektrophorese (3.7.2), Blotting (3.7.3), Proteindetektion durch spezifische Antikörper (3.7.4), densitometrische Quantifizierung der Western Blot-Bandenprodukte (3.7.5), stereologische Quantifizierung Laminin gefärbter zerebraler Gefäße (3.8.3) und die Statistik (3.9). Die Datenerhebung erfolgte verblindet, das heißt der Experimentator hatte weder Kenntnis des Genotyps noch des Geschlechts des jeweils untersuchten Versuchstiers.

#### 3.2 Mausmodelle und Tierhaltung

Folgende Gründer-Mausstämme wurden zur Generierung des *mKlk8-Knockdown* (murines Kallikrein-8) Stammes verwendet:

##### TgCRND8-Mäuse

Diese Mäuse sind hemizygot transgen (Tg, [*hAPP*<sup>+/-</sup>]) und zeigen eine Überexpression des humanen Amyloid-Precursor-Proteins 695 (hAPP 695), gesteuert durch den syrischen Hamster-Prion-Protein-Promoter, auf dem hybriden C57BL/6-C3H/HeJ Hintergrundstamm. Sie besitzen die Doppelmutationen „Swedish“ und „Indiana“ innerhalb des *hAPP*-Gens [KM670/671NL & V717F]. In TgCRND8 Tieren zeigen sich extrazelluläre A $\beta$  Plaques mit prädominantem A $\beta$ 42-Anteil ab dem postnatalen Tag 90 (P90) und dystrophe Veränderungen der Neuriten ab 5 Monaten (Chishti et al., 2001). Bereits ab P30 tritt vor allem im Hippokampus, aber auch in anderen Gehirnarealen, wie Neokortex und Zerebellum, ein Überschuss von KLK8 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene auf (Herring et al., 2016). Kognitive Defizite, wie Einschränkungen der

räumlichen Gedächtnisleistung, zeigen sich ab P90 (Chishti et al., 2001). Wildtypische Tiere des hybriden Hintergrundstamms C57BL/6-C3H/HeJ dienen als nicht-transgene Kontrollen.

#### Kallikrein-8-Knockout Mäuse (*Klk8*-KO)

Hierbei handelt es sich um Mäuse mit homozygotem *Knockout* (KO) bezüglich des murinen *Klk8* [*mKlk8*<sup>-/-</sup>]. Hintergrundstamm ist C57BL/6J (B6.129P2-Klk8<tm1Shio>, RIKEN BioResource Center). Diese Mäuse zeichnen sich durch synaptische und neuronale Veränderungen aus. Morphologische Veränderungen des Zellsomas und die Reduktion der inhibitorischen, asymmetrischen Synapsen stehen einer Zunahme von Vesikel gefüllten, unspezialisierten Boutons sowie einer erhöhten Anzahl von Parvalbumin-immunoreaktiver Zellen gegenüber (Hirata et al., 2001). Darüber hinaus zeigen die *mKlk8-Knockout* Mäuse verminderte kognitive Fähigkeiten und Gedächtnisleistungen sowie fehlende Generierung von frühen Langzeitpotenzialen im Hippokampus (Tamura et al., 2006). Die Mäuse sind lebensfähig und fertil (Davies et al., 2001).

#### Generierung des Intermediär-Stammes:

- *mKlk8*<sup>-/-</sup> (C57BL/6 Hintergrundstamm)
- *mKlk8*<sup>+/+</sup> (C3H/HeJ Hintergrundstamm)

Die Grundlage der Zucht bildete die Kreuzung von männlichen Mäusen, welche einen *mKlk8-Knockout* (*mKlk8*<sup>-/-</sup>) aufwiesen mit Weibchen des Hintergrundstammes C3H/HeJ, deren *mKlk8*-Genotyp dem Wildtyp entsprach (*mKlk8*<sup>+/+</sup>). Auf diese Weise entstand für die weitere Verpaarung ein *mKlk8-Knockdown*, dessen Hintergrundstamm C57BL/6-C3H/HeJ dem TgCRND8-Modell entspricht:

- *mKlk8*<sup>+/-</sup> (Die Mäuse waren: heterozygot für *mKlk8*, Hintergrundstamm: C57BL/6-C3H/HeJ  
→ Mäuse mit 50% KLK8-Reduktion.

Der Intermediär-Stamm zeigte keine zusätzlichen Pathologien im Vergleich zu den Gründerstämmen und war lebensfähig.

Zucht der Experimentaltiere

Ziel war die Zucht transgener Mäuse mit permanent reduzierter KLK8-Expression. Die Verpaarung von 10 männlichen, transgenen Mäusen mit AD-Pathologie und KLK8-Überschuss (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>) mit 10 weiblichen, nicht-transgenen Mäusen ohne AD-Pathologie und mit 50% reduzierter KLK8-Expression (*hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>) fand ab P90 statt. Daraus entstanden die Experimentaltiere mit folgenden Genotypen:

- *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>
  - ➔ transgene Mäuse mit AD-Pathologie, deren KLK8-Expression um 50% reduziert war (im Vergleich zu den TgCRDN8 Mäusen).
- *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>
  - ➔ transgene Mäuse mit AD-Pathologie, die einen zerebralen KLK8-Überschuss aufweisen (Herring et al., 2016).
- *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>
  - ➔ nicht-transgene Mäuse ohne AD-Pathologie, deren KLK8-Expression um 50% reduziert war (im Vergleich zu Mäusen vom Wildtyp).
- *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>
  - ➔ nicht-transgene Mäuse ohne AD-Pathologie, die eine physiologische KLK8-Expression zeigen.

Auch die Experimentaltiere waren lebensfähig und zusätzliche Pathologien konnten im Vergleich zu den Gründerstämmen und dem Intermediär-Stamm nicht detektiert werden.

Tabelle 1: Mäuse

Generation	Tier	Eigenschaften	Hersteller/ Züchter
Gründermaus-stämme	TgCRND8 Mäuse	<b>Genotyp:</b> <i>hAPP</i> <sup>+/-</sup> ➔ Transgen hemizygot <b>Phänotyp:</b> -Überexpression von hAPP -AD ähnliche Pathologie Mutationen: Swedish, Indiana: [KM670/671NL & V717F] Promotor: syrischer Hamster Prion Promotor Hintergrundstamm: C57BL/6-C3H/HeJ	Tanz Center for Research in Neurodegenerative Diseases, Universität Toronto, Kanada

Gründermaus-stämme	<i>Klk8</i> -KO Mäuse	<b>Genotyp:</b> <i>mKlk8</i> <sup>-/-</sup> → Homozygot: <i>mKlk8</i> - <i>Knockout</i> Hintergrundstamm: C57BL/6J <b>Phänotyp:</b> -verminderte kognitive Fähigkeiten	RIKEN BioResource Center (B6.129P2-Klk8<tm1Shio> Stamm) Tsukuba, Japan
Intermediär-Stamm		<b>Genotyp:</b> <i>mKlk8</i> <sup>+/-</sup> Hintergrundstamm: C57BL/6-C3H/HeJ <b>Phänotyp:</b> -50% KLK8-Reduktion	Institut für Neuropathologie, Essen
Experimentaltiere		<b>1.Genotyp:</b> <i>hAPP</i> <sup>+/-</sup> ; <i>mKlk8</i> <sup>+/-</sup> → hemizygot transgen für <i>hAPP</i> , heterozygot für <i>mKlk8</i> <b>Phänotyp:</b> -AD ähnliche Pathologie -50% KLK8-Reduktion <b>2.Genotyp:</b> <i>hAPP</i> <sup>+/-</sup> ; <i>mKlk8</i> <sup>+/+</sup> → hemizygot transgen für <i>hAPP</i> , homozygot für <i>mKlk8</i> <b>Phänotyp:</b> -AD ähnliche Pathologie - zerebraler KLK8- Überschuss <b>3.Genotyp:</b> <i>hAPP</i> <sup>-/-</sup> ; <i>mKlk8</i> <sup>+/-</sup> → nicht-transgen für <i>hAPP</i> , heterozygot für <i>mKlk8</i> <b>Phänotyp:</b> -keine AD ähnliche Pathologie -50% KLK8-Reduktion <b>4.Genotyp:</b> <i>hAPP</i> <sup>-/-</sup> ; <i>mKlk8</i> <sup>+/+</sup> → nicht-transgen für <i>hAPP</i> , homozygot für <i>mKlk8</i> <b>Phänotyp:</b> -keine AD ähnliche Pathologie -KLK8-Expression physiologisch	Institut für Neuropathologie, Essen

### 3.2.1 Haltung der Mäuse

Alle Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen unter Standardbedingungen (SH, Standardhaltung) in Makrolon Typ III Käfigen gehalten. Zu jeder Zeit stand den Mäusen Futter und Wasser zur freien Verfügung. Bis P30 wurde der Nachwuchs zusammen mit dem Muttertier gehalten. Anschließend erfolgte die Trennung vom Muttertier und die Aufteilung in gleichgeschlechtliche Gruppen von 3-4 Mäusen bis P207 unter Standardbedingungen. Um die Einflussnahme des elterlichen Genotyps auf die Phänotypen der Experimentalmäuse zu minimieren, wurde die gleiche Anzahl an Tieren aus jedem Wurf auf die verschiedenen Gruppen aufgeteilt.

Die Genotypisierung aller Mäuse wurde an P30 mittels konventioneller Polymerase Kettenreaktion (PCR) für *hAPP*, *mKlk8* und die „*murine Sex determining region Y*“ (*mSry*, zur Verifizierung des Geschlechts) durchgeführt. Die Verwendung verschiedener Primer ermöglichte die genaue Identifizierung der Genotypen *mKlk8*<sup>+/-</sup> und *mKlk8*<sup>+/+</sup>. Zur Kontrolle der *mKlk8*-Expression wurde eine *real-time* PCR durchgeführt, welche eine Reduktion um 50% in *Knockdown* Mäusen (*mKlk8*<sup>+/-</sup>) im Vergleich zu *mKlk8*<sup>+/+</sup> Mäusen bestätigte.

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium wurden die Experimentaltiere verschiedenen Verhaltenstests unterzogen.

### 3.3 Verhaltensphänotypisierung

Vor Durchführung der Verhaltensphänotypisierung (P207-P213) wurden die Experimentaltiere für eine Woche an einen invertierten Tag-Nacht-Rhythmus angepasst. Die Verhaltensphänotypisierung diente der Erfassung von Ängstlichkeit, Aktivität, Erkundungsverhalten sowie des Objekt-Wiedererkennens und fand in fortgeschrittenem Krankheitsstadium zwischen P214-P216 statt. Mittels *Elevated-Plus-Maze* (EPM) wurde die Ängstlichkeit (Young et al., 2008) an P214 ermittelt. Die Testung der generellen Aktivität und des Erkundungsverhaltens wurde mit Hilfe des *Open-Field*-Tests (OF) (Kilic et al., 2010) an P215 durchgeführt. Die Bestimmung des Objekt-Wiedererkennungsgedächtnisses erfolgte mit Hilfe des *Novel Object Recognition* Tests (NOT) an P216. Der NOT wurde in der OF Arena durchgeführt. Daher diente der *Open-Field* Test als Habituationsphase für den NOT.

Eine Reinigung der Testflächen fand nach jedem Test mit 70%igem Ethanol (s. Tab. 9) statt.

### 3.4 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte an  $P226 \pm 0.77$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Stichprobenmittelwertes, *Standard Error of the Mean*, SEM). Um die Mäuse in Anästhesie mit Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) zu töten, wurde der CO<sub>2</sub>-Anteil des Kohlendioxid-Sauerstoff-Gemischs (Flussrate 1,8 l/Min.) stetig erhöht. Nach der Tötung erfolgte die Dekapitation mit Gehirnexzision. Das Gehirn wurde in medianer Sagittalebene geschnitten, wobei die linke Hemisphäre für immunhistologische Untersuchungen verblieb, während der Neokortex der rechten Hemisphäre getrennt isoliert und für molekulare Untersuchungen weiterverarbeitet wurde.

Folgende Tierzahlen wurden pro Gruppe im Rahmen meiner Dissertation analysiert:

- transgene Mäuse mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie:
  - weiblich *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12
  - weiblich *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12
  - männlich *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12
  - männlich *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=11
- nicht-transgene Mäuse ohne Alzheimer-ähnliche Pathologie:
  - weiblich *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=10
  - weiblich *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12
  - männlich *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=13
  - männlich *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12

### 3.5 Quantifizierung der zerebralen Gefäßdichte

#### 3.5.1 Vorarbeiten

Zur Quantifizierung der zerebralen Gefäßdichte wurde das Gewebe der linken Hemisphäre nach Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung in 10 µm dicke koronare Schnitte geschnitten und diese im Anschluss im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger

überführt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation im Wärmeschrank bei 60°C für 1 Stunde, weitere 2-3 Tage bei 40°C und noch einmal über Nacht bei 50°C. Im Anschluss daran erfolgte die Rehydrierung. Durch dreimaliges Waschen der Schnitte in Xylol (s. Tab. 8) wurde die Paraffineinbettung entfernt. Danach fanden drei Inkubationsschritte für je 1 Minute (Min.) mit Alkohol statt, 2 Mal mit 100% Ethanol, 2 Mal mit 96% Ethanol und 1 Mal mit 70% Ethanol. Zum Abschluss wurde mit Aqua destillata (Aqua Dest.) gereinigt.

Pro Tier wurden 6 Schnitte (mit jeweils 100 µm Abstand zwischen den Schnitten) immunhistologisch gegen Laminin gefärbt.

### 3.5.2 Laminin-Immunhistochemie

Die Färbung beruht auf einer doppelten AK-Bindungsreaktion, welche dem Prinzip der Proteindetektion im Western Blot entspricht (s. Erläuterung in 3.7.4). Der Primärantikörper bindet für die Immunhistochemie das Protein Laminin in den Basalmembranen der Gefäßwände (Thomsen et al., 2017), welche durch den Substratumsatz im histologischen Schnitt farblich dargestellt werden.

Für die Färbung wurden die Schnitte zur besseren Zugänglichkeit der Antigene vorbehandelt. Dies erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei 37°C mit 0,4% Pepsin (s. Tab. 8), gelöst in 10 mM Salzsäure (HCl) (s. Tab. 9). Daran schloss sich eine Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, als *Peroxidase-Blocking Solution*, s. Tab. 9) für 5 Min. an. Nach einem Waschgang mit Waschpuffer (s. Tab. 9) konnten die Schnitte im Autostainer plus (DAKO, s. Tab. 10) gefärbt werden. Jedem Inkubationsschritt folgte ein Spülgang mit Waschpuffer. Als Erstes wurde den Schnitten 200 µl prä-Block (s. Tab. 2, Prä- und Postblock) zugeführt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Laminin an (L9393, Sigma Aldrich, 1:300, 0,7 µl AK in 210 µl *Diluent*). Die Negativkontrolle erfolgte mit 200 µl *Diluent* (s. Tab. 9). Anschließend wurden für 30 Min. 200 µl eines Meerrettichperoxidase-Polymer-Sekundärantikörpers (Englisch: *Horseradish Peroxidase*, HRP) (s. Tab. 2) hinzugegeben. Zuletzt wurden 4 µl 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) (s. Tab. 9) in 200 µl *Diluent* für 10 Min. zugefügt. Das DAB fungiert als Reagenz für die HRP, welche das Benzidin in ein bräunliches

Substrat umgesetzt, so dass im histologischen Schnitt die Blutgefäße bräunlich dargestellt werden. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Cytoseal XYL (s. Tab. 9) und Deckgläschen eingedeckt.

Tabelle 2: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Immunhistochemie

Gebrauchsfertige Lösungen/ Kits	Zusammensetzung, Hersteller
ZytoChem Plus HRP Polymer System (Prä- und Postblock, Mouse/ Rabbit)	Zytomed Systems GmbH, Berlin REF: POLHRP-100

### 3.5.3 Stereologische Quantifizierung Laminin gefärbter zerebraler Gefäße

Die Stereologie diente der Quantifizierung der zerebralen Blutgefäßdichte. Zur Visualisierung wurden ein Lichtmikroskop (Nikon 80i, s. Tab. 10) und eine Farbdigitalkamera genutzt, welche eine Verbindung zum Programm Stereo Investigator 11 (s. Tab. 10) aufwies. Zunächst wurde die Kontur der jeweiligen zu analysierenden anatomischen Struktur (Neokortex, Hippokampus und Basalganglien) zur Flächenbestimmung des Areal bei einer 20-fachen Vergrößerung eingezeichnet. Die Zählung der Blutgefäßverzweigung erfolgte bei einer 200-fachen Vergrößerung, einer Belichtung von 35 Millisekunden (ms), in einem Zählrahmen der Größe 300 x 300  $\mu\text{m}$  und einer Rastergröße von 425 x 425  $\mu\text{m}$ . Mit Hilfe des *Fractionators* wurden 49% der anatomischen Struktur randomisiert ausgezählt und die Auswertung dieser Areale auf 100% extrapoliert. Gezählt wurden sowohl Gefäßknotenpunkte, definiert als Gefäßgabelung mit mindestens 2 Abgängen, sowie Gefäßendpunkte. Die Anzahl der Gefäßverzweigungen wurde durch die Formel  $(\text{Gefäßendpunkte} + \text{Gefäßknotenpunkte}) / 2$  berechnet und in Relation zur Fläche des jeweils analysierten Gehirn-Areals gesetzt ( $n/\text{mm}^2$ ).

## 3.6 Quantifizierung der zerebralen A $\beta$ -Transporter-Expression

### 3.6.1 Extraktion von DNA, RNA und Proteinen

Zur Extraktion der DNA, RNA und Proteine wurden dem Neokortex der rechten Hemisphäre 800  $\mu\text{l}$  TRIzol™ Reagenz (s. Tab. 9) zugegeben. Mittels Mikro-Dismembrator S (s. Tab. 10) wurden die Gewebeprobe anschließend für 2 Min.

bei 2.500 rpm (Englisch: *Revolutions per Minute*) homogenisiert. Dies bildete die Grundlage für die Extraktion von DNA, RNA und Proteinen.

#### Phasentrennung:

Im Anschluss an die Homogenisierung erfolgte ein erneutes Zuführen von 800 µl TRIzol™ Reagenz mit darauffolgender 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (s. Tab. 9) und kurzer Durchmischung schloss sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Min. an. Mittels Zentrifugation (15 Min. bei 4°C und 13.000 rpm) erfolgte die Phasentrennung, woraufhin die Proben auf Eis gelagert wurden. Zuerst befand sich eine wässrige Phase, in welcher die RNA gelöst war. Darunter bildete sich eine DNA-enhaltende Grenzschicht und am Grund die Phenol/Chloroform-Phase, in der sich Proteine befanden. Die oberste, RNA-enhaltende Phase wurde in ein neues Gefäß mit 500 µl TRIzol™ überführt. Durch erneute Zugabe von 100 µl Chloroform zur RNA-enhaltenden Phase, Invertierung, Inkubation (2 Min. bei Raumtemperatur) und anschließende Zentrifugation (15 Min. bei 4°C und 13.000 rpm) erfolgte eine erneute Phasentrennung. Hierdurch wurde die RNA-enhaltende Phase aufgereinigt.

#### Fällung der RNA:

Nach erneuter Überführung der oberen (RNA-enhaltenden) Phase in ein neues Gefäß fand durch Zugabe von 800 µl Isopropanol (s. Tab. 9) die Fällung der RNA statt. Dafür erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendes Zentrifugieren (30-60 Min. bei 4°C und 13.000 rpm). Auf diese Weise entstand ein RNA-Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch zweimalige Zugabe von 1 ml 80% Ethanol in Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O, s. Tab. 8 und Tab. 9), Invertieren, Zentrifugieren (5 Min. bei 4°C und 13.000 rpm) und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Für die Trocknung des RNA-Pellets wurde das Gefäß kopfüber auf einem Tuch gelagert, um das verbliebene Ethanol zu entfernen. Durch Zugabe von 20 µl gekühltem DEPC-H<sub>2</sub>O (s. Tab. 8) und Durchmischung mittels Auf- und Abpipettieren wurde das RNA-Pellet gelöst. Die Lagerung fand anschließend bei -80°C statt.

### DNA-Isolierung

Die DNA wurde mittels Ethanol ausgefällt und zu einem Pellet verarbeitet. Dafür wurden 480 µl 100% Ethanol zur unteren und Intermediär-Phase hinzugegeben, invertiert und für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation (5 Min. bei 4°C und 5.000 rpm) erwirkte eine Trennung in ein DNA-Pellet und einen Proteine enthaltenden Überstand. Der Überstand wurde für die anschließende Proteinextraktion in 2 weitere Gefäße überführt. Durch Zugabe von 1,6 ml 0,1M Natriumcitrat Lösung (in 10% Ethanol) (s. Tab. 9) zum DNA-Pellet, Inkubation für 30 Min. mit zeitweiligem Mischen und anschließender Zentrifugation (5 Min. bei 4°C und 5.000 rpm) wurde das DNA-Pellet gewaschen und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde daraufhin wiederholt. Das Hinzufügen von 2 ml 75% Ethanol, anschließende Inkubation für 15 Min. bei Raumtemperatur und erneutes Zentrifugieren (5 Min. bei 4°C und 5.000 rpm) vervollständigten den Waschschrift. Um die DNA zu lösen, wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet 10 Min. an der Luft getrocknet und anschließend in 400 ml 8 mM Natriumhydroxid (NaOH) (s. Tab. 9) gelöst. Die endgültige Lagerung erfolgte auch hier bei -80°C.

### Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurde der, in der DNA-Isolierung entstandene Überstand mit den gelösten Proteinen verwendet. Hierfür wurden 2,4 ml Isopropanol zur Proteinfällung zugeführt (1,2 ml pro Gefäß), durchmischt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (10 Min. bei 4°C und 13.000 rpm) entstanden Proteinpellets, welche nach Verwerfen des Überstandes 3 Mal mit je 3,2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid Lösung (in 95% Ethanol, 1,6 ml pro Gefäß, s. Tab. 8) für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 Min. bei 4°C und 10.000 rpm) wurden. Nach Verwerfen des Überstandes, Zugabe von 1,6 ml (800 µl pro Gefäß) 100% Ethanol, Zentrifugation (5 Min. bei 4°C und 10.000 rpm) und erneutem Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets einer Probe zusammengeführt, zerkleinert und im Heizblock (40°C für 15-20 Min.) getrocknet. Gelöst wurden die Proteinpellets unter Verwendung eines Proteaseinhibitorcocktails (1:1,000, s. Tab. 8) sowie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1:100, s. Tab. 8) in 800 µl 1% *Sodium Dodecyl*

*Sulfate* (SDS, s. Tab. 8 und Tab. 9, in Aqua dest.), während sie bei 40°C geschüttelt und zwischendurch beschallt wurden. Bei Sedimentbildung erfolgte eine Zentrifugation zur Aufreinigung des Protein-Überstandes. Die Langzeitlagerung der Proteinlysate fand bei -80 °C statt.

### 3.6.2 Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem Verfahren nach Lowry (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Grundlage ist hier die Bildung eines farbigen Komplexes, der sich photometrisch quantifizieren lässt. Dieses Verfahren basiert auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen:

- a) Bei der Biuretreaktion gehen zweiwertige Kupferionen in alkalischer Lösung einen blauvioletten, quadratisch planaren Komplex mit Peptidbindungen ein.
- b) Diese Kupferionen werden anschließend reduziert ( $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ ). Die einwertigen Kupferionen reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und es entsteht Molybdänblau. Seitenketten bestimmter Aminosäuren begünstigen diesen Reduktionsprozess.

Durch diese zweite Farbreaktion ist die Methode sehr sensitiv. Es liegt eine Korrelation zwischen Proteinmenge und Farbintensität vor, weshalb die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt werden kann. Grundlage hierfür bildet das Lambert-Beersche-Gesetz.

Für die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry wurden die Proteinproben des Neokortex in 1 % SDS verdünnt (1 zu 10 und 1 zu 20).

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte als Triplikat für jede Verdünnungsstufe, sodass für jedes Protein 6 Messungen erfolgten. Je 5 µl der verdünnten Proteinproben wurden in die Vertiefungen (*Wells*) der Microtiterplatte (96 *well*-Platte (Nunc), s. Tab. 10) pipettiert. Mit Hilfe eines Proteinstandards, in diesem Falle Rinder-Serum-Albumin-Verdünnungen (bovines-Serum-Albumin, BSA, s. Tab. 8) wurde eine Verdünnungsreihe zum Erstellen einer Eichkurve angefertigt. Mit je 5 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden weitere *Wells* beladen. Die Negativkontrolle erfolgte mit 1% SDS. Die Messung des Proteinstandards sowie der Negativkontrolle erfolgten ebenfalls als Triplikatmessungen. Im nächsten Schritt wurde die

komplexbildende Lösung hergestellt. Hierfür wurde zunächst Reagenz A' durch Mischung der beiden Reagenzien S (SDS in wässriger Lösung) und A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung auf NaOH-Basis) (s. Tab. 3) erzeugt. Je 25 µl des Reagenz A' sowie jeweils 200 µl des Reagenz B (Folin-Reagenz) (s. Tab. 3) wurden allen beladenen *Wells* zugefügt und diese, nach vorsichtigem Durchmischen, für 15 Min. inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm mittels Photometer (Multiskan FC, Thermofisher Scientific, s. Tab 10).

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Lowry

<b>Gebrauchsfertige Lösungen/ Kits</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller</b>
DC Protein Assay Kit II	5000112 Bio-Rad, München, BRD
Reagenz A (Lowry)	5000113 Protein Assay Reagent A, Bio Rad, München
Reagenz B (Lowry)	5000114 Protein Assay Reagent B, Bio Rad, München
Reagenz S (Lowry)	5000115 Protein Assay Reagent S, Bio Rad, München

### 3.6.3 Fluoreszenz-Gelelektrophorese

Anhand der, in der Lowry ermittelten Proteinkonzentrationen, wurden die Proteinauftragsmengen für den Western Blot errechnet. Zur Sicherung gleicher Protein-Auftragsmengen im Western Blot wird eine Ladekontrolle benötigt, welche zur Normierung der Proteinexpressionslevel in den verschiedenen Proben dient. Diese Ladekontrolle wurde mittels Fluoreszenz-Gelelektrophorese durchgeführt.

Hierfür wurden Polyacrylamidgеле (TGX *stain free gels*, s. Tab. 4 und Tab. 8) gegossen und anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine (s. Arbeitsschritt 3.7). Nach Schwenken der Gele im 1x SDS-Laufpuffer (s. Tab. 8) wurden diese durch 5-minütige Anregung mit UV-Licht mittels ChemiDoc™ XRS+ System (s. Tab. 10) aktiviert, indem Trihaloverbindungen im Gel mit Tryptophanen in den Proteinen reagierten. Durch die Einstellung „UV-Transillumination“, konnte das Bandenmuster, dessen Intensität proportional zum Tryptophananteil der Proteine ist, sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe des Programms Image Lab 2.0 (s. Tab. 10), wurde das Bandenmuster in Zahlenwerte umgewandelt und die Gesamtproteinmenge errechnet. Alle Proben wurden hintergrundkorrigiert (*Local Subtraction Method*). Eine homogene Intensität der Banden bei Messung der

verschiedenen Proteinproben bestätigte gleiche Proteinkonzentrationen im Auftrag, was die Grundlage für die Verwendung im Western Blot ist. Für jede Probe wurde mindestens eine Duplikat-Bestimmung durchgeführt. Wichen die Duplikate um mehr als 10% voneinander ab, erfolgte eine dritte Messung.

Tabelle 4: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Fluoreszenzgel

<b>Gebrauchsfertige Lösungen/ Kits</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller</b>
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, 161-0183gt, Bio-Rad

### 3.6.4 Immunoblot (Western Blot)

Ein Hauptbestandteil meiner experimentellen Dissertation umfasste den quantitativen Nachweis von A $\beta$ -Transportproteinen der Blut-Hirn-Schranke der neurovaskulären Einheit. Hierfür wurde mittels Immunoblot (Western Blot) eine Quantifizierung der Proteine MDR1, LRP1 und RAGE (Sweeney et al., 2019) im Neokortex vorgenommen. Der Western Blot setzt sich aus der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach Molekulargröße sowie anschließender Übertragung des Bandenmusters auf eine Nitrozellulosemembran zusammen (Blotting). Auf dieser Membran erfolgt die Detektion des gewünschten Proteins mittels spezifischer Primärantikörper und Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper, welche das im Anschluss zugegebene Substrat, Luminol, zu einem chemilumineszierenden Produkt umsetzen. Die Kamera des ChemiDoc™ XRS+ Systems (s. Tab. 10) detektiert und quantifiziert die lumineszierenden Signale. Die Sensitivität der Methode wird durch den indirekten Proteinnachweis mittels Sekundärantikörper (mehrere Sekundärantikörper können einen Primärantikörper binden) sowie dessen Enzymkopplung (ein Enzym setzt mehrere Reagenzmoleküle um) erhöht, wodurch eine deutliche Signalverstärkung entsteht.

#### 3.6.4.1 Probenvorbereitung und Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Vorbereitung des Western Blots umfasste die adäquate Präparation der Proben sowie das Gießen der Polyacrylamidgele.

Die zuvor extrahierten Proteine wurden aus der bei -80°C stattfindenden Lagerung kurzzeitig herausgeholt und bei 40°C im Eppendorf ThermoMixer® compact (s. Tab. 10)

aufgetaut. Die aufgetauten Proteinproben wurden mit SDS-Standard Lysispuffer sowie 5x  $\beta$ -Mercaptoethanol-SDS-Auftragspuffer (s. Tab. 8) vermischt, sodass sich eine Proteinmenge von 20  $\mu\text{g}$  in 25  $\mu\text{l}$  Volumen für jede Spur ergab. Jede Probe wurde in einem einzelnen Gefäß vorbereitet. Die beiden zugefügten Puffer unterstützen die thermische Denaturierung/Reduktion. Das anionische Detergens SDS lagert sich an die Proteine an und überdeckt deren Eigenladung, da es selbst stark negativ geladen ist. Der 5x  $\beta$ -Mercaptoethanol-SDS-Auftragspuffer fungiert als Reduktionsmittel und löst die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen zur weiteren Unterstützung der Denaturierung auf. Im Thermomixer wurden die Proben bei 95°C denaturiert (für 5 Min.), im Anschluss daran 5 Min. gekühlt und abschließend (5 Min., 2.000 rpm) zentrifugiert.

Darüber hinaus mussten die SDS-Polyacrylamidgele gegossen werden. Diese setzten sich aus einem unten lokalisierten Trenngel zur elektrophoretischen Auftrennung (10% Acrylamid) und einem oben aufliegenden Sammelgel (4% Acrylamid) zur Fokussierung der Proteine zusammen. Die jeweiligen Ingredienzien (s. Tab. 8) wurden unter Rühren zusammen pipettiert und anschließend zwischen bereitstehende Glasplatten gegossen. Um bei den Trenngelen einen ebenen Oberflächenspiegel zu erhalten, wurde Isopropanol auf die noch flüssige Gelmasse gegeben. Nach 25-minütiger Aushärtung unter dem Abzug wurde das Isopropanol wieder entfernt und die Glasplatten bis zum Rand mit Sammelgel befüllt. Zur späteren Beladung mit den angesetzten Proben wurden Kämmen mit 10 Vertiefungen in das Sammelgel gedrückt und die Gele 25 Min. ausgehärtet.

#### 3.6.4.2 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide* Gel Elektrophorese (SDS PAGE nach Laemmli). Hierfür wurden die Polyacrylamidgele nach einem festgelegten Pipettierschema mittels *Hamilton*-Pipette beladen (20  $\mu\text{g}$  Protein pro Vertiefung). Zur späteren Orientierung diente der Auftrag eines Proteinmarkers (*Color Prestained Protein Standard*, s. Tab. 9). Dabei handelt es sich um eine Mischung gereinigter, an einen Farbstoff gekoppelter Proteine definierter Größe, welche sich während einer Elektrophorese in 12 Banden auftrennen. Anhand dieser Banden kann der Elektrophorese-Fortschritt, der Blotting-Erfolg sowie das ungefähre Molekulargewicht von Proteinen ermittelt bzw. überwacht werden. Als

Laufmedium für die Elektrophorese diente 1x SDS-Laufpuffer (s. Tab. 8). Die Elektrophorese fand im Mini-PROTEAN® Tetra System (s. Tab. 10) bei konstant 120 Volt statt und umfasste einen zeitlichen Rahmen von 1-2 Stunden (abhängig vom Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine). Zur orientierenden Abschätzung der Lokalisation der Protein-Lauffront diente das Bromphenolblau im 5x  $\beta$ -Mercaptoethanol-SDS-Auftragspuffer (s. Tab. 8).

### 3.6.4.3 Blotting

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele aus ihren Glasrahmen gelöst und für 10 Min. im gekühlten 1x Blotpuffer bei Raumtemperatur äquilibriert (s. Tab. 8). Parallel dazu wurden auch die weiteren, für das Blotting notwendigen Utensilien (Nitrozellulosemembranen, Filter und Schwämme) in 1x Blotpuffer äquilibriert. Das Blotting fand nach dem Tank-Blot-Verfahren nach Towbin statt, bei dem die aufgetrennten, negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel, entlang eines senkrecht verlaufenden elektrischen Feldes, auf die Nitrozellulosemembran übertragen werden. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran auf das Polyacrylamidgel aufgebracht und von Filtern und Schwämmen in festgelegter Anordnung umgeben, sodass sich die Membran zwischen dem Polyacrylamidgel und der positiv geladenen Elektrode befand. Das Blotting fand bei konstanten 0,25 Ampere für 1 Stunde und 10 Min. bei 4°C und unter kontinuierlicher Puffer-Zirkulation statt. Die Kontrolle des Proteintransfers auf die Membran erfolgte, nach einem Waschgang von 5 Min. mit 1x *Tris-buffered saline with Tween20* (TST, s. Tab. 8), durch eine Färbung mit *Ponceau S* (s. Tab. 9). Der Farbstoff bindet reversibel an Proteine und ermöglicht dadurch die Lokalisation der übertragenen Proteinbanden. Im Anschluss daran wurde die Membran mit 1x TST entfärbt.

### 3.6.4.4 Proteindetektion durch spezifische Antikörper

Die proteinbeladenen Membranen aus dem Blotting wurden zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Proteine zurechtgeschnitten. Zur Orientierung dienten die Banden des Proteinmarkers, entlang derer mittels Skalpell die Membranen waagrecht getrennt wurden (in ausreichendem Abstand zu der jeweils nachzuweisenden Proteinbande).

Um unspezifische AK-Bindungen zu vermeiden, erfuhren die zurechtgeschnittenen Nitrozellulosemembranen eine Blockierung durch die Inkubation mit 5% Magermilchpulver (MMP) in 1x TST-Lösung (s. Tab. 8). Die im Magermilchpulver enthaltenen Milchproteine lagern sich dabei an die Oberfläche der Membran an und sättigen damit freie Bindungsstellen ab, an denen der AK unspezifisch binden könnte. Dies wird durch Tenside des TSTs noch unterstützt. So werden Hintergrundsignale reduziert. Für LRP1 und RAGE betrug die Blockierungszeit 30 Min., für die Visualisierung von MDR1 wurden die Membranen 45 Min. lang blockiert.

Die Proteindetektion beruht auf einer doppelten AK-Bindungsreaktion. Ein Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen, in diesem Falle MDR1, LRP1 oder RAGE. Der Zweitantikörper ist gegen die Tierspezies, in der der Primärantikörper generiert wurde, gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt, hier Meerrettichperoxidase (HRP). Die doppelte AK-Reaktion wird zur Verstärkung des Signals genutzt, da so mehrere Sekundärantikörper einen Primärantikörper binden können. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase reduziert ein hinzugegebenes Peroxid-Reagenz proportional zur gebundenen Peroxidase-Menge. Das Peroxid-Reagenz fungiert als Oxidationsmittel für Luminol, bei dessen Oxidation bläuliches Licht (Chemilumineszenz) entsteht, welches mit einer Kamera detektiert werden kann.

Nach erfolgter Blockierung fand die Inkubation mit dem Primärantikörper in ausgetesteter Verdünnung, gelöst im Blockierungsmedium (s. Tab. 5), bei 4°C auf einem Schüttler über Nacht statt. Am darauffolgenden Tag wurde die Primärantikörper-Lösung abgegossen und verbleibende Reste durch zweifaches Waschen mit 1x TST für jeweils 10 Min. entfernt. Es folgte eine neuerliche Blockierung mit 5% MMP-1x TST und daran anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s. Tab. 6) für 1 Stunde bei Raumtemperatur, ebenfalls gelöst im Blockierungsmedium. Abgießen der Antikörper-Milch-Mischung und 3 Waschgänge mit 1x TST für je 10 Min. entfernten überschüssige Reste des Sekundärantikörpers und die Membranen waren bereit zur Proteinvisualisierung mittels Luminol. Diese fand mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS+ Systems statt. Dafür wurden je 1 ml der beiden *Enhanced Chemiluminescenc*-Lösungen (ECL-Lösung) (s. Tab. 7), bestehend aus Luminol und Peroxid-Reagenz, vermischt und die Membranen für eine Minute damit benetzt. Für die Quantifizierung von MDR1 und RAGE war die Standardlösung ausreichend, doch die

Bildgenerierung von LRP1 benötigte den Einsatz einer hochsensitiven ECL-Variante (s. Tab. 7). Das, durch die Luminoloxidation entstandene, bläuliche Licht (Chemilumineszenz) konnte mit der Kamera des ChemiDoc™ XRS+ Systems und dem Programm Quantity One (s. Tab. 10) erfasst werden. Die Bildeinstellungen, wie Zoom, Belichtungszeit und Bildanzahl, wurden über die Software Quantity One reguliert. Pro Western Blot wurden 8 Proteinproben (je eine Probe pro Gruppe) gleichzeitig untersucht.

Tabelle 5: Primärantikörper Western Blot

Bezeichnung	Verdünnung	Artikelnummer, Hersteller
Anti-MDR1 (Rabbit)	1:1.000	TA319318, Acris
Anti-RAGE (Rat)	1:750	MAB11795, R&D Systems
Anti-LRP1 (Mouse)	1:500	438192, Calbiochem

Tabelle 6: Sekundärantikörper Western Blot

Bezeichnung	Verdünnung	Artikelnummer, Hersteller
Anti-Rabbit-HRP (MDR1)	1:5.000	111-035-003 Jackson Immuno Research
Anti-Rat-HRP (RAGE)	1:15.000	A9037 Sigma-Aldrich
Anti-Mouse-HRP (LRP1)	1:10.000	A3682 Sigma-Aldrich

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits

Gebrauchsfertige Lösungen/ Kits	Zusammensetzung, Hersteller
Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (Hochsensitives ECL)	GE Healthcare Life Sciences UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire UK, RPN2235
Millipore Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate (Normales ECL)	Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 USA, Merck KGaA, Darmstadt WBKLS0500

### 3.6.4.5 Densitometrische Quantifizierung der Western Blot-Bandenprodukte

Die, mittels Kamera des ChemiDoc™ XRS+ Systems erstellten Bilder, zeigten das Bandenmuster des jeweiligen Proteins. Zur Überführung in Zahlenwerte bedurfte es der Software Image Lab 2.0, welche die Signalintensität der Bandenmuster densitometrisch erfasste und quantifizierte. Auch hier erfolgte eine Hintergrundkorrektur der Signale. Die so gewonnenen Werte wurden gegen die zuvor ermittelten Gesamtproteinmengen aus der Fluoreszenzgel-Analyse normiert.

Alle Proben wurden im Duplikat gemessen. Bei einer Divergenz der Duplikate von über 10% erfolgte die Anfertigung eines Triplikats.

Tabelle 8: Lösungen und Puffer

<b>Lösung und Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
0,3M Guanidinhydrochlorid-95%-Ethanol-Lösung	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 14,33 g Guanidin-HCl 25 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 475 ml Ethanol 100%
0,5M EDTA pH 8,0	<u>Für 1 L Ansatz:</u> 186,1 g EDTA in 800 ml Aqua dest. lösen mit NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
1% SDS-Lösung	<u>Für 1% SDS:</u> 1g SDS in 100ml Aqua dest. lösen
10 x SDS – Laufpuffer Lagerung bei 4°C	Ansatz für 1l: 144g Glycin 39g Tris 19g SDS auf 1l mit Aqua dest. auffüllen
10% APS	<u>Für 50 ml Ansatz:</u> 5 g Ammoniumperoxodisulfat mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen
100 mM EGTA	<u>Für 100 ml Ansatz:</u> 3,8035 g EGTA mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
10x TST-Puffer Lagerung bei 4°C	Ansatz für 1l: 100 ml 1M Tris/ HCl, pH 7,6 300 ml 5M NaCl (Natriumchlorid) 5 mg=5 ml Tween 20 Mit Aqua dest. Auf 1l auffüllen
5% Magermilchlösung Lagerung bei 4°C	5% Magermilchpulver (w/v) in 1x TST 50 g MMP ad 1x TST 1000 ml (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)
5x β-Mercaptoethanol-SDS-Auftragspuffer Lagerung lichtgeschützt	1 ml/ 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml β-Mercaptoethanol 0,4 ml Bromphenolblau (1% Stock) 4 ml Aqua Dest
Blotpuffer	<u>Ansatz für 1l:</u> 14,4 g Glycin 3,03 g Tris 200 ml Methanol Mit Aqua dest. Auf 1 l auffüllen
BSA Proteinstandard	5000007 Protein Standard II, Bio Rad, München
DEPC-H <sub>2</sub> O	500 µl DEPC in 500 ml Aqua dest. verrühren
Fluoreszenz-Sammelgel 4%	1 ml FastCast™ Stacker A, 10% 1 ml TGX Stain-Free™ FastCast™ Stacker B

	15 µl 10% APS 3 µl TEMED
Fluoreszenz-Trenngel 10%	3 ml FastCast™ Resolver A, 10% 3 ml TGX Stain-Free™ FastCast™ Resolver B 45 µl 10% APS 4,5 µl TEMED
Lower Tris pH 8,8	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 90,855 g Tris 2 g SDS pH 8,8 mit HCl 37% einstellen mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
Pepsin (from porcine gastric mucosa)	Sigma Aldrich P6887-1G
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	P7626, Sigma-Aldrich
Ponceau S (0,5% Stock)	<u>Ansatz für 100 ml:</u> 0,5 g Ponceau S 1 ml Eisessig 98,5 ml A. dest
Proteaseinhibitorcocktail	P8340, Sigma-Aldrich
Protein Extraktionspuffer	50 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 150 mmol/l NaCl 5 mmol/l EDTA 10 ml/l NP-40 0.5% Proteinaseinhibitor Sigma #P8340
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel 4%	415 µl Acrylamid/Bisacrylamid 625 µl Upper Tris= (60,56Tris/ 0,5M, 4g SDS/ 0,4%, ad 1000 ml A. dest., pH 6,8 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C) 1460 µl Aqua dest. 20 µl APS (10%) 5 µl Temed
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 10%	2330 µl Acrylamid 1750 µl Lower Tris= (181,71g Tris/ 1,5 M, 4 g SDS/ 0,4%, ad 1000 ml A. dest, pH 8,8 mit HCl, Lagerung bei 4°C) 2920 µl Aqua dest. 50 µl APS (10%) 10 µl Temed
Standard-Lysispuffer	10 mM Tris/HCL, pH 8,0 150 mM NaCl 2% IGEPAL 1% Natriumdesoxycholat 1 mM EDTA 1 mM Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-N,N'- Tetraessigsäure (EGTA)
Upper Tris pH 6,8	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 30,28 g Tris 2 g SDS pH 6,8 mit HCl 37% einstellen mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
Xylol	Formafix, Düsseldorf

Tabelle 9: Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
20x IHC-Waschpuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg WL583C2500 DCS
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Antikörper <i>Diluent</i>	Zytomed Systems, ZUC025-500
Aqua B. Braun (destilliertes Wasser)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main P7712S
Cytoseal XYL, (resin-based mounting medium)	Thermo Scientific, USA, 8321-4
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark DAKO REF: K5007
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark REF: S2023
DEPC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ethanol 100 %	Honeywell International Inc.; Morristown, USA
Glycerol zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol, J.T.Baker®	Avantor, Radnor, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat, BioXtra	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
RNaseZap®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Roti®-C/I (Chloroform)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamidstammllösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37, 5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 2mol/L-2N Lösung ROTIPURAN®	Art.-Nr. T134.1 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS, ultra pure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Skim Milk Powder (MMP)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumhydroxid (Sodium hydroxide solution) (10 M NaOH in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, 3580.3
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIZol™ Reagent, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, 15596-018
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

### 3.7 Statistik

Die gesammelten Daten wurden im Anschluss statistisch aufbereitet.

Die Prüfung der Normalverteilung fand mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest, der Anfertigung eines Q-Q-Plots (Quantil-Quantil-Diagramm) sowie eines Histogramms statt. Der Levene-Test wurde durchgeführt, um die Varianzhomogenität zu überprüfen. Asymmetrisch verteilte Daten (RAGE), wurden logarithmisch in eine symmetrische Verteilung transformiert (mittels Logarithmus naturalis: RAGE\_LN). Der Einfluss des Geschlechts wurde mittels Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA), (Zwischensubjektfaktoren: weiblich; männlich) getestet. Bei fehlendem Einfluss durch das Geschlecht wurden die Daten von weiblichen und männlichen Tieren des gleichen Genotyps zusammengefasst (Geschlechts gepoolt) und gemeinsam für die weitere Statistik verwendet (gilt für: zerebrale Gefäßdichte, MDR1). Ein Mehrgruppenvergleich normalverteilter Daten mit den Zwischensubjektfaktoren transgen (*hAPP*+/-; *hAPP*-/-), *mKlk8*-Genotyp (*mKlk8*+/+; *mKlk8*+/-) und Geschlecht (weiblich; männlich, nur bei Einfluss des Geschlechts) wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem LSD-*post-hoc*-Test durchgeführt (Gefäßdichte im Hippokampus, MDR1 und RAGE). Bei nicht normalverteilten Daten oder Daten ohne Varianzhomogenität erfolgte der Mehrgruppenvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Mann-Whitney-U-Tests (LRP1). Es wurde ein Signifikanzlevel ( $\alpha$ ) von  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Statistik wurde mit Hilfe von SPSS 22 (s. Tab. 10) durchgeführt.

Die im weiteren Verlauf der Arbeit aufgeführten Werte sind Angaben der Mittelwerte mit Standardfehler des Stichprobenmittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM).

Tabelle 10: Geräte und Programme

Gerät und Programme	Hersteller
96 well-Platte und Microplate Photometer	Nunc™ MicroWell™ 96-Well Platte, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Autostainer plus (DAKO)	Agilent Technologies
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad, München Laboratories Inc., Hercules, USA
Eppendorf Research®, Pipette 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf ThermoMixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg
Farbdigitalkamera, 3/4" chip, 36-bit color, DV-20	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA
Hamilton Pipette, 50 µl, Model 705 RN	Hamilton Company, Reno, USA

Heracus™ Pico™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific™, Waltham, MA USA
Image Lab 2.0	Bio Rad, München
Magnetrührer, lab disc	VWR International GmbH, Darmstadt
MaxQ 2000 Open-Air Platform Shaker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikro-Dismembrator S	(85030-522-30) (Sartorius AG, Göttingen
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Nikon Eclipse 80i Mikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Photometer Multiskan FC	Thermofisher Scientific, Typ 357, REF: 51119000
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA
Präzisionswaage, Sartorius Talent	Sartorius AG, Göttingen
Protran Nitrocellulose Membrane Filters	Whatman, Porengröße 0,2 µm, VWR International GmbH Darmstadt
Quantity One 1-D Analysis Software	Bio Rad, Laboratories Inc., Hercules, USA
SPSS 22 software	IBM
Stereo Investigator® 11 Software	MicroBriedField
Vortex-Genie 2 Mixer	Scientific Industries, Inc., New York, USA

### 3.8 Versuchsgenehmigung

Für dieses Forschungsprojekt liegt eine Genehmigung seitens des LANUV NRW vor. Das LANUV NRW bewilligte die Zucht, Dekapitation und Gehirnexzision (AZ 84-02.04.2014.A488). Alle Experimente wurden nach den EU-Richtlinien 2010/63/EU für Tierexperimente durchgeführt und folgten den ARRIVE Vorgaben.

## 4 ERGEBNISSE

Für diese Arbeit wurde der Effekt eines *mKlk8-Knockdowns* auf die neurovaskuläre Einheit im Rahmen der AD-Pathologie (genauer: AD-ähnliche Pathologie) im transgenen Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Bestandteil eines umfangreichen Projekts des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen zu Effekten des *mKlk8-Knockdowns* auf die AD-Pathologie und wurden in diesem Rahmen bereits veröffentlicht.

### 4.1 Auswirkung des *mKlk8-Knockdowns* auf die zerebrale Gefäßdichte

Untersucht wurde die Auswirkung eines *mKlk8-Knockdowns* auf die zerebrale Gefäßdichte mittels stereologischer Quantifizierung Laminin gefärbter Blutgefäße in Hippokampus, Neokortex und den Basalganglien. Die Färbung gegen Laminin stellt die Basalmembranen der Gefäße dar, welche zu einem großen Anteil aus Laminin und weiteren Proteinen, wie Kollagen oder Proteoglykan, bestehen (Thomsen et al., 2017).

#### 4.1.1 Der *mKlk8-Knockdown* erhöht die Gefäßdichte im Hippokampus transgener weiblicher und männlicher Mäuse

Die zerebralen Gefäße sind ein wichtiger Pfeiler in der A $\beta$ -Eliminierung bei der AD (Sweeney et al., 2019). Vorherige Arbeiten zeigten eine Schädigung sowie Reduktion der zerebralen Gefäßdichte im Rahmen der AD (Sweeney et al., 2018b). Kurzzeitige, AK-vermittelte KLK8-Blockade führte zu einer Erhöhung der Gefäßdichte in gesunden (nicht-transgenen) Mäusen (Herring et al., 2016).

Mit dieser Arbeit sollten langfristige Effekte einer KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die Gefäßdichte AD-erkrankter (transgener) sowie gesunder (nicht-transgener) Mäuse bei Männchen und Weibchen ermittelt werden.

Übereinstimmend mit bestehenden Erkenntnissen (Kent et al., 2020; Sweeney et al., 2019) konnte durch stereologische Auswertung Laminin gefärbter Hirnschnitte gezeigt werden, dass sich die AD (AD-ähnliche Pathologie) negativ auf die Gefäßdichte (im murinen Hippokampus) auswirkt. Transgene Mäuse zeigten demnach

eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte im Hippokampus im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren ( $P=0,000044$ , ca. -13%) (s. Abbildung 1A+B).

Die Reduktion der pathologisch erhöhten KLK8-Spiegel im Rahmen der AD-ähnlichen Pathologie verbesserte die zerebrale Gefäßdichte. Dies zeigte sich anhand einer Erhöhung der Gefäßdichte im Hippokampus transgener Mäuse mit *mKlk8-Knockdown*, im Vergleich zu transgenen Tieren ohne *mKlk8-Knockdown* ( $P=0,0040$ , ca. +9%), auf das Niveau wildtypischer Tiere (s. Abbildung 1A+B).

Auf die hippokampale Gefäßdichte gesunder Mäuse hatte ein *mKlk8-Knockdown* keinen Einfluss ( $P>0,1$ ) (s. Abbildung 1A+B).

Geschlechtsunterschiede konnten für die Gefäßdichte nicht gezeigt werden ( $P>0,05$ ), weshalb die Angaben Geschlechts gepoolt dargestellt wurden.

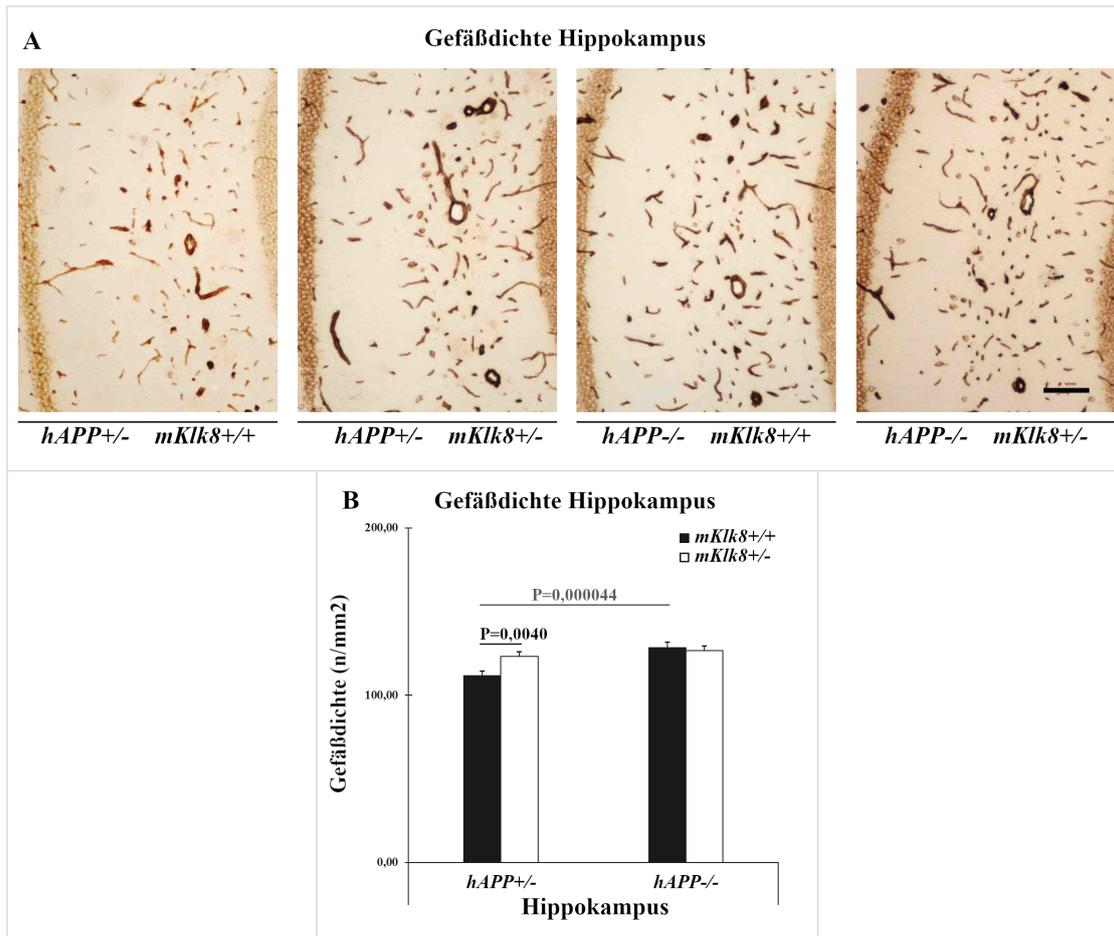


Abbildung 1 Erhöhung der Gefäßdichte im Hippokampus durch den *mKlk8-Knockdown* in transgenen Mäusen. (A) Repräsentative Aufnahmen Laminin gefärbter Gefäße im Hippokampus. Lichtmikroskopische Bilder mit einer 100-fachen Vergrößerung. Eichbalken 100  $\mu$ m. (B) Quantitative Darstellung der Laminin gefärbten Blutgefäße im Hippokampus als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). Einheit: Gefäßverzweigungen pro Quadratmillimeter (n/mm<sup>2</sup>). Transgene Mäuse mit normaler *mKlk8*-Expression (*hAPP+/-*; *mKlk8+/+*, schwarze Farbgebung, phänotypisch KLK8-Exzess in transgenen Mäusen) zeigten eine reduzierte hippocampale Gefäßdichte im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren (*hAPP-/-*; *mKlk8+/+*, schwarz). Der *mKlk8-Knockdown* erhöhte die Gefäßdichte im Hippokampus dieser transgenen Mäuse (*hAPP+/-*; *mKlk8+/-*, weiß). Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post-hoc*-Test. Angabe der Signifikanzen durch p-Werte. P-Wert in grau: Transgeneffekt; Vergleich transgener Mäuse (*hAPP+/-*) mit nicht-transgenen Mäusen (*hAPP-/-*). P-Wert in schwarz: *Knockdown*-Effekt; Vergleich von Mäusen ohne *mKlk8-Knockdown* (*mKlk8+/+*) mit Mäusen mit *mKlk8-Knockdown* (*mKlk8+/-*). Gruppengrößen: transgen: *hAPP+/-*; *mKlk8+/+*: n=24; *hAPP+/-*; *mKlk8+/-*: n=23; nicht-transgen: *hAPP-/-*; *mKlk8+/+*: n=23; *hAPP-/-*; *mKlk8+/-*: n=24.

#### **4.1.2 Der *mKlk8-Knockdown* zeigt keinen Einfluss auf die Gefäßdichte in Neokortex und Basalganglien transgener weiblicher und männlicher Mäuse**

Eine zeitlich begrenzte, Antikörper-vermittelte zerebrale KLK8-Inhibition zeigte in vorherigen Arbeiten eine positive Auswirkung auf die Gefäßdichte in Neokortex und Basalganglien, zumindest in nicht-transgenen Mäusen (Herring et al., 2016).

Dagegen ergab die Analyse der neokortikalen Gefäßdichte im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Veränderungen. Weder die AD-ähnliche Pathologie noch der *mKlk8-Knockdown* beeinflussten die neokortikale Gefäßdichte ( $P > 0,1$ ) (s. Abbildung 2A).

Auch in den Basalganglien zeigten sich keine signifikanten Effekte des *mKlk8-Knockdowns* auf die Gefäßdichte, weder in transgenen noch in nicht-transgenen Tieren ( $P > 0,1$ ) (s. Abbildung 2B).

Die fehlende Beeinflussung der Gefäßdichte in Neokortex und Basalganglien könnte darauf zurückzuführen sein, dass *per se* bei den transgenen Tieren in den beiden Arealen (Neokortex und Basalganglien) keine relevante Beeinträchtigung der Gefäßdichte durch die AD-ähnliche Pathologie im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren auftrat ( $P > 0,1$ ) (s. Abbildung 2A+B).

Zudem zeigten sich zwischen den Geschlechtern in diesen beiden Arealen keine nennenswerten Unterschiede in der Gefäßdichte, weshalb die Daten Geschlechts gepoolt dargestellt wurden.

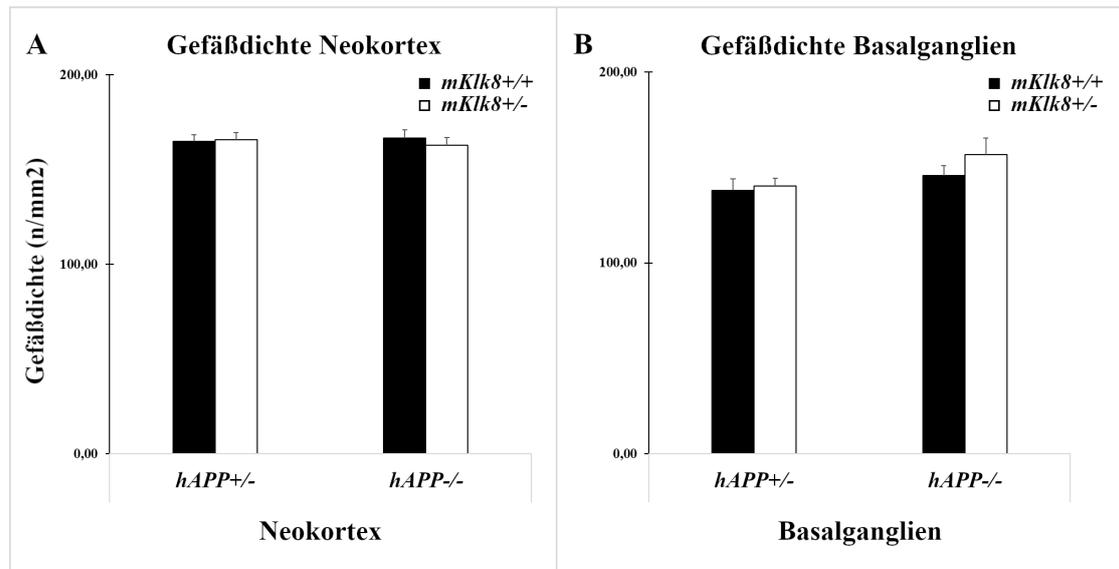


Abbildung 2 Kein Einfluss des *mKlk8*-Knockdowns auf die Gefäßdichte im Neokortex und den Basalganglien. (A) Quantitative Darstellung der Laminin gefärbten Blutgefäße im Neokortex als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). Einheit: Gefäßverzweigungen pro Quadratmillimeter (n/mm<sup>2</sup>). Weder der *mKlk8*-Knockdown noch die AD-ähnliche Pathologie beeinflussen die Gefäßdichte. Dargestellt ist die Gefäßdichte in nicht-transgenen (*hAPP*<sup>-/-</sup>) und transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>+/-</sup>) bei normaler *mKlk8*-Expression (*mKlk8*<sup>+/+</sup>, schwarz, phänotypisch KLK8-Exzess in transgenen Mäusen) sowie bei verringerter *mKlk8*-Expression durch *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8*<sup>+/-</sup>, weiß). (B) Darstellung der stereologisch quantifizierten Laminin gefärbten Blutgefäße in den Basalganglien als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). Weder der *mKlk8*-Knockdown noch die AD-ähnliche Pathologie beeinflussen die Gefäßdichte. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post-hoc*-Test. Gruppengrößen: transgen: *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=24; *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=23; nicht-transgen: *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=23; *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=24.

## 4.2 Auswirkungen des *mKlk8-Knockdowns* auf Transportproteine der Blut-Hirn-Schranke

Der Effekt des *mKlk8-Knockdowns* auf die A $\beta$ -Transportproteine der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden die Proteinlevel der A $\beta$ -Effluxtransporter *Multidrug Resistance Protein 1B* (MDR1), *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1* (LRP1) und des A $\beta$ -Influxtransporters *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) im Neokortex nachgewiesen.

### 4.2.1 Der *mKlk8-Knockdown* erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters MDR1 in transgenen Mäusen beider Geschlechter

Das, besonders an der luminalen Seite der zerebralen Gefäße lokalisierte MDR1, reduziert die zerebrale A $\beta$ -Last durch einen ATP-abhängigen A $\beta$ -Efflux über die BHS (Lam et al., 2001; Sweeney et al., 2019). Die MDR1-Aktivität wird durch die AD-Pathologie kompromittiert (Sweeney et al., 2019; Vogelgesang et al., 2004), doch mittels KLK8-AK Gabe kann dieser Reduktion entgegengewirkt werden (Herring et al., 2016). In Übereinstimmung mit bestehenden Erkenntnissen (Herring et al., 2016; Sweeney et al., 2019; Vogelgesang et al., 2004) konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die AD-ähnliche Pathologie die MDR1-Spiegel vermindert. So wiesen transgene Mäuse eine signifikante Reduktion der neokortikalen MDR1-Expression auf (P=0,0001, ca. -26%) (s. Abbildung 3A+B).

Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *mKlk8-Knockdown* der pathologischen Reduktion der MDR1-Expression (im Neokortex) entgegenwirken kann. Durch den *mKlk8-Knockdown* erhöhte sich die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters MDR1 transgener Mäuse (P=0,0037, ca. +26%) auf Werte ähnliche denen der nicht-transgenen Mäuse (s. Abbildung 3A+B).

Gesunde Mäuse profitierten nicht von reduzierten KLK8-Spiegeln, sondern hier wurde die MDR1-Expression beeinträchtigt. Dies zeigte sich in einer signifikanten Reduktion der neokortikalen MDR1-Expression durch den *mKlk8-Knockdown* bei nicht-transgenen Mäusen ( $P=0,0324$ , ca. -13%) (s. Abbildung 3A+B).

Auch für die MDR1-Expression zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, weshalb die Daten Geschlechts gepoolten dargestellt wurden.

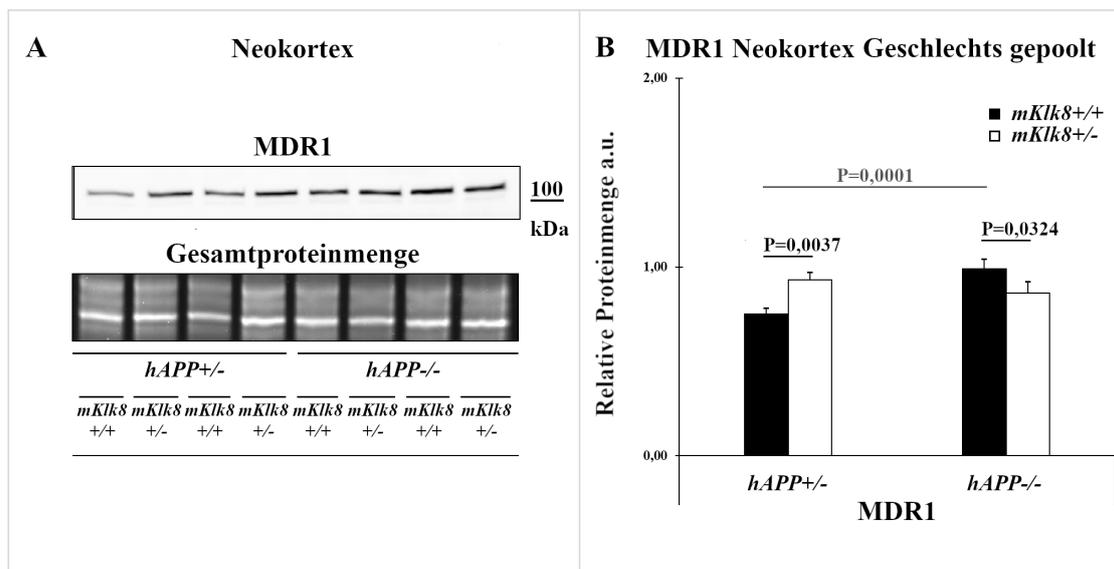


Abbildung 3 Der *mKlk8-Knockdown* erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters MDR1 im Neokortex transgener Mäuse. (A) Repräsentative Aufnahmen der MDR1-Expression im Neokortex nach Proteinauffrennung und Antikörpermarkierung (Angaben s. Anhang) im Western Blot sowie Darstellung der Gesamtproteinmenge (Fluoreszenz-Gelelektrophorese). Die Proteinlevel der Western Blots wurden gegen die Gesamtproteinmenge normiert. Orientierende Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). (B) Darstellung der relativen Proteinlevel von MDR1 aus den Geschlechts gepoolten Analysen der Western Blots als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). Transgene Mäuse mit normaler *mKlk8*-Expression (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>, schwarze Farbgebung, phänotypisch KLK8-Exzess in transgenen Mäusen) zeigten eine signifikante Reduktion der MDR1-Expression, welche durch einen *mKlk8-Knockdown* (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>, weiß) auf Werte nicht-transgener Mäuse angehoben werden konnte. Bei nicht-transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>, weiß) reduzierte der *mKlk8-Knockdown* die MDR1-Expression signifikant. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post-hoc*-Test. Signifikanzen mittels p-Wert angegeben. P-Wert in schwarz: *Knockdown*-Effekt; Vergleich von Mäusen ohne *mKlk8-Knockdown* (*mKlk8*<sup>+/+</sup>) mit Mäusen mit *mKlk8-Knockdown* (*mKlk8*<sup>+/-</sup>). P-Wert in grau: Transgeneffekt; Vergleich transgener Mäuse (*hAPP*<sup>+/-</sup>) mit nicht-transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>-/-</sup>). Einheiten: a.u.= *arbitrary units* (relative Einheiten). Gruppengrößen: transgen: *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=24; *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=23; nicht-transgen: *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=23; *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=24.

#### 4.2.2 Der *mKlk8-Knockdown* erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters LRP1 in weiblich-transgenen Mäusen

Als Vermittler eines Großteils der A $\beta$ -*Clearance* über die BHS (Storck et al., 2016) sowie durch seine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der BHS-Integrität (Nikolakopoulou et al., 2021) hat LRP1 eine große Bedeutung in der AD-Pathologie. Die Verstärkung der pathologischen Prozesse, durch Reduktion der zerebralen LRP1-Level bei der AD (Shibata et al., 2000), kann mittels einmonatiger KLK8-Blockade und nachfolgender LRP1-Expressionssteigerung vermindert werden (Herring et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Effekt einer permanenten KLK8-Reduktion durch *mKlk8-Knockdown* auf die neokortikale LRP1-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die AD-ähnliche Pathologie in transgenen Weibchen die LRP1-Expression (im Neokortex) beeinträchtigt. So zeigte die getrenntgeschlechtliche Analyse signifikant geringere LRP1-Level in transgenen Weibchen ohne *mKlk8-Knockdown* im Vergleich zu männlichen Mäusen desselben Genotyps ( $P=0,000022$ , ca. -32%) (s. Abbildung 4A+C).

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass besonders transgene Weibchen von der KLK8-Reduktion profitierten. Der *mKlk8-Knockdown* bewirkte in weiblich-transgenen Mäusen eine signifikante Erhöhung der neokortikalen LRP1-Expression ( $P=0,0007$ , ca. +26%), während bei den männlichen Mäusen keine relevanten Veränderungen detektierbar waren (s. Abbildung 4A+C).

Gesunde Mäuse zeigten keinen Effekt durch die reduzierten KLK8-Spiegel (im Neokortex). Dies stellte sich in unveränderten neokortikalen LRP1-Spiegeln bei nicht-transgene Mäuse mit *mKlk8-Knockdown* dar (s. Abbildung 4A+B).

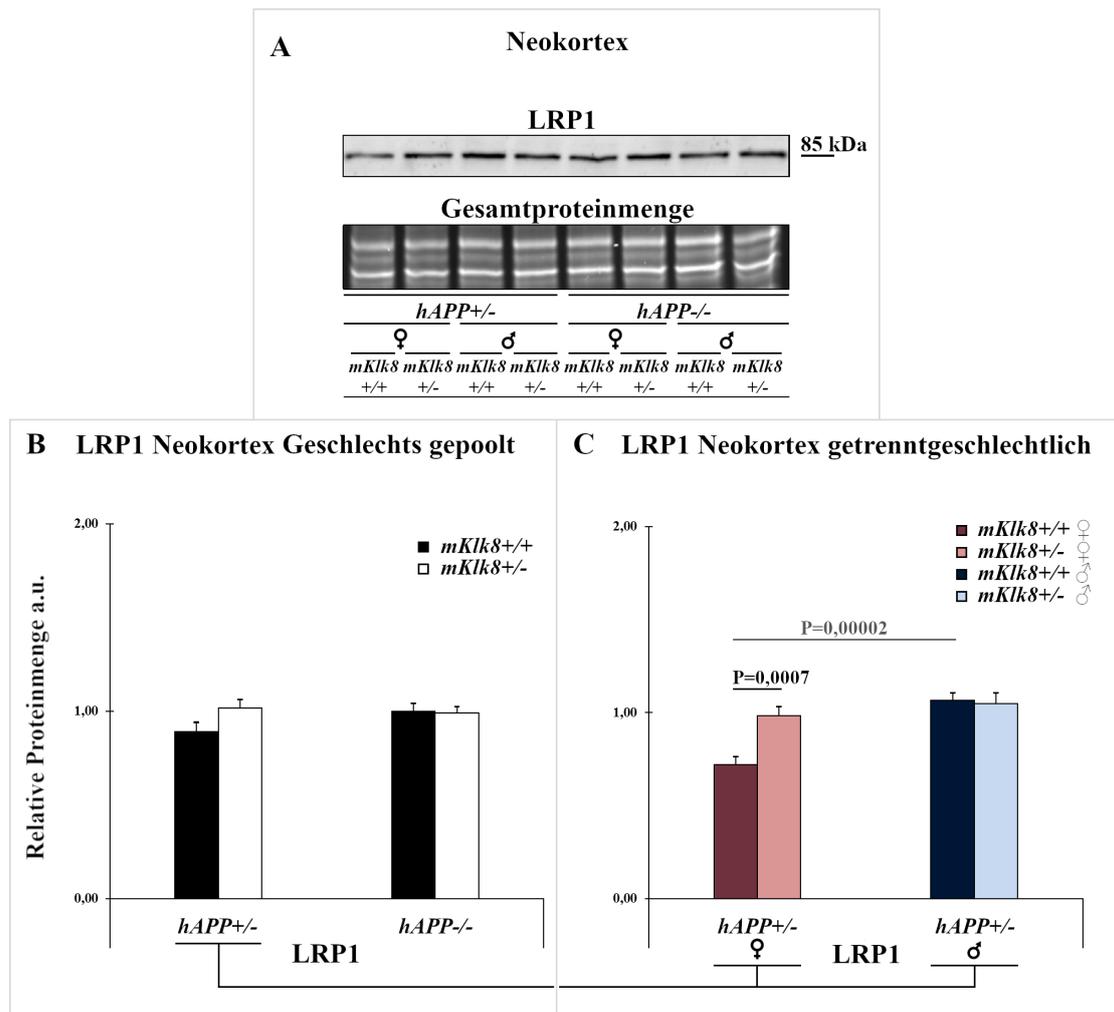


Abbildung 4 Der *mKlk8*-Knockdown erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters LRP1 im Neokortex transgener Weibchen. (A) Repräsentative Aufnahme der LRP1-Expression im Neokortex nach Proteinauftrennung und Antikörpermarkierung (Angaben s. Anhang) im Western Blot sowie Darstellung der Gesamtproteinmenge (Fluoreszenz-Gelelektrophorese). Die Proteinlevel der Western Blots wurden gegen die Gesamtproteinmenge normiert. Orientierende Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). (B) Darstellung der relativen Proteinmengen von LRP1 aus der Geschlechts gepoolten Analyse der Western Blots als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). In der Geschlechts gepoolten Analyse zeigten sich keine Unterschiede. (C) Der *mKlk8*-Knockdown erhöhte die neokortikale LRP1-Expression in weiblichen, transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>, ♀, rosé) im Vergleich mit den weiblich-transgenen Mäusen ohne *mKlk8*-Knockdown (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀, rot). Bei den Männchen (♂, blau) zeigten sich keine relevanten Veränderungen der LRP1-Expression. Transgene Weibchen (*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀, rot) zeigten eine verminderte LRP1-Expression im Vergleich mit Männchen desselben Genotyps (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♂, blau). Die Statistik für LRP1 wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließenden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Signifikanzen mittels p-Wert angegeben. P-Wert in schwarz: *Knockdown*-Effekt; Vergleich von Mäusen ohne *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8*<sup>+/+</sup>) mit Mäusen mit *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8*<sup>+/-</sup>). P-Wert in grau: Transgeneffekt; Vergleich transgener Mäuse (*hAPP*<sup>+/-</sup>) mit nicht-transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>-/-</sup>). Gruppengrößen: transgen: ♀ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12; ♀ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=11; nicht-transgen: ♀ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=10; ♀ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=13; ♂ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12. Einheiten: a.u.= arbitrary units (relative Einheiten).

### 4.2.3 Der *mKlk8-Knockdown* reduziert die Expression des A $\beta$ -Influxtransporters RAGE in weiblich-transgenen Mäusen

Das Transportprotein RAGE vermittelt an der luminalen Seite der zerebralen Gefäße den Influx von löslichem A $\beta$  aus dem Blut ins Gehirn, wirkt proinflammatorisch und beeinträchtigt die vaskuläre Integrität (Deane et al., 2012; Wan et al., 2015). Die RAGE-Expression ist bei der AD früh erhöht (Paudel et al., 2020). Eine vierwöchige KLK8-AK-Therapie in transgenen Tieren bewirkte keinen Effekt auf die RAGE-Spiegel (Herring et al., 2016).

Im Rahmen der getrenntgeschlechtlichen Analyse der RAGE-Expression konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass besonders AD-erkrankte Weibchen von permanent reduzierten KLK8-Spiegeln profitieren. So verringerte der *mKlk8-Knockdown* in weiblich-transgenen Mäusen die neokortikale Expression von RAGE signifikant ( $P=0,0444$ , ca. -18%) (s. Abbildung 5A+C).

In transgenen Männchen hatte ein *mKlk8-Knockdown* keinen signifikanten Effekt auf die neokortikale RAGE-Expression ( $P>0,1$ ) (s. Abbildung 5A+C).

Auch bei nicht-transgenen Mäusen bewirkte eine KLK8-Reduktion weder in Weibchen noch in Männchen eine Veränderung der RAGE-Expression (im Neokortex) (s. Abbildung 5A+B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in Bezug auf die neurovaskuläre Einheit transgene Mäuse von der *mKlk8*-Reduktion profitieren, da mittels *mKlk8-Knockdown* der verminderten zerebralen Gefäßdichte und MDR1-Reduktion in transgenen Tieren entgegengewirkt werden konnte. Besonders scheinen transgene Weibchen zu profitieren, bei denen zusätzlich die neokortikalen LRP1-Level anstiegen und die RAGE-Expression durch den *mKlk8-Knockdown* vermindert wurde.

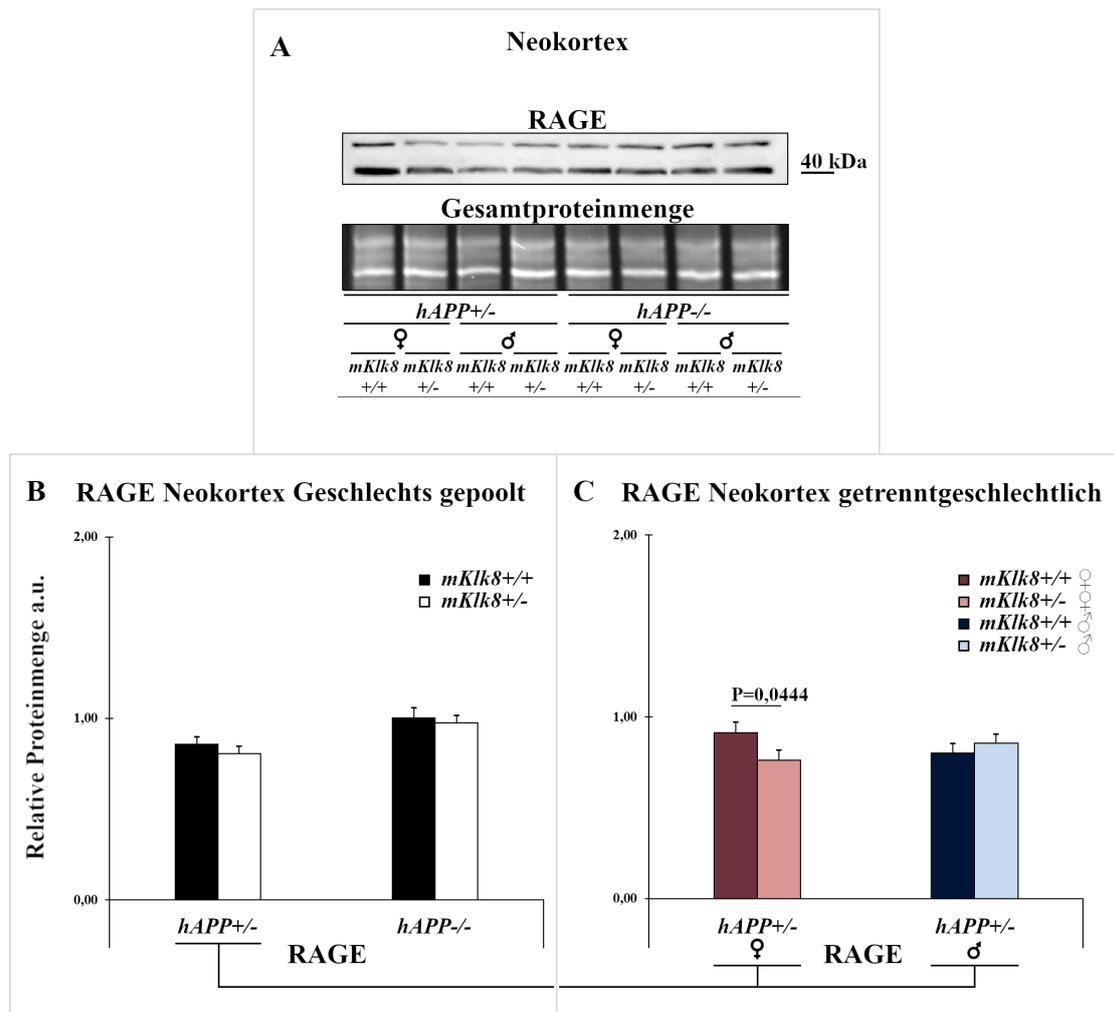


Abbildung 5 Der *mKlk8*-Knockdown reduziert die neokortikale Expression des A $\beta$ -Influxtransporters RAGE in transgenen Weibchen. **Modifiziert nach (Herring et al., 2021)**. (A) Repräsentative Aufnahme der RAGE-Expression im Neokortex nach Proteinauftrennung und Antikörpermarkierung (Angaben s. Anhang) im Western Blot sowie Darstellung der Gesamtproteinmenge (Fluoreszenz-Gelelektrophorese). Die Proteinlevel der Western Blots wurden gegen die Gesamtproteinmenge normiert. Orientierende Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). (B) Darstellung der relativen Proteinmengen von RAGE aus der Geschlechts gepoolten Analyse der Western Blots als Säulendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM). In der Geschlechts gepoolten Analyse zeigten sich keine Unterschiede. (C) Der *mKlk8*-Knockdown reduzierte die RAGE-Expression weiblich-transgener Mäuse (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>, ♀, rosé) im Vergleich mit den weiblich-transgenen Mäusen ohne *mKlk8*-Knockdown (*hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀, rot). Bei den Männchen (♂, blau) zeigten sich keine relevanten Veränderungen der RAGE-Expression. Die Statistik für RAGE wurde mittels ANOVA und LSD-*post-hoc*-Test durchgeführt. Für RAGE erfolgte eine logarithmische Transformation der Daten. Signifikanzen mittels p-Wert angegeben. P-Wert in schwarz: *Knockdown*-Effekt; Vergleich von Mäusen ohne *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8*<sup>+/+</sup>) mit Mäusen mit *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8*<sup>+/-</sup>). P-Wert in grau: Transgeneffekt; Vergleich transgener Mäuse (*hAPP*<sup>+/-</sup>) mit nicht-transgenen Mäusen (*hAPP*<sup>-/-</sup>). Gruppengrößen: transgen: ♀ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12; ♀ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>+/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=11; nicht-transgen: ♀ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=10; ♀ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12; ♂ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/+</sup>: n=13; ♂ *hAPP*<sup>-/-</sup>; *mKlk8*<sup>+/-</sup>: n=12. Einheiten: a.u.= *arbitrary units* (relative Einheiten).

## 5 DISKUSSION

Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese der AD noch weitgehend ungeklärt, doch aktuelle Studien liefern Hinweise einer initialen Beteiligung der Protease KLK8 an diesem Prozess (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021; Keyvani et al., 2018). Bekannt ist zudem, dass bei der prädominanten LOAD (Reitz and Mayeux, 2014) besonders die A $\beta$ -*Clearance* kompromittiert ist (Tarasoff-Conway et al., 2015). Auf molekularer Ebene sind an der BHS lokalisierte Transportproteine der neurovaskulären Einheit (NVU) für diese wichtige *Clearance*-Funktion zuständig (Shibata et al., 2000; Sweeney et al., 2019), weshalb die Untersuchung der NVU von besonderer Bedeutung ist. Diese erfolgte im Rahmen meiner Arbeit mittels stereologischer Quantifizierung der zerebralen Gefäßdichte sowie Western Blot Analysen der BHS-Transportproteine, geschlechtsgetrennt in AD-erkrankten (transgenen, TgCRND8) Mäusen (mit AD-ähnlicher Pathologie) mit und ohne *mKlk8-Knockdown*. Die Kontrollgruppe bildeten gesunde (nicht-transgene) Mäuse desselben Hintergrundstammes, ebenfalls mit physiologischer- sowie, *mKlk8-Knockdown*-vermittelt, verminderter KLK8-Expression. Mit dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die vermehrte KLK8-Expression im transgenen Mausmodell der AD zur Schädigung der NVU beiträgt. Die genetische KLK8-Reduktion (via *mKlk8-Knockdown*) ermöglichte eine Restitution dieser Beeinträchtigung, womit den Alzheimer-assoziierten pathologischen Veränderungen entgegenwirkt werden konnte.

### 5.1 Reduktion exzessiv erhöhter Kallikrein-8-Spiegel verbessert die NVU-Dysfunktion

Zahlreiche Studien befassen sich mit der zerebralen Gefäßaffektion im Rahmen der AD. Vielfach zeigte sich eine eingeschränkte Blutversorgung einhergehend mit reduzierter Gefäßdichte sowie strukturellen Gefäßschädigungen (Kent et al., 2020; Sweeney et al., 2019), deren funktionelle Relevanz sich auch in verminderter *Clearance* bestätigte (Sweeney et al., 2019). Molekulare Grundlage dieser Schädigung ist unter anderem die aberrante Expression der BHS-Transportproteine. Diese verändert sich hin zu einem pro-A $\beta$ -akkumulierenden Milieu mit Reduktion der Effluxtransporter bei

gleichzeitiger Überexpression A $\beta$  aufnehmender Influxtransporter (Jia et al., 2020; Sweeney et al., 2019).

Kongruent dazu konnte ich mit dieser Arbeit eine verminderte hippocampale Gefäßdichte in AD-erkrankten Mäusen bestätigen, welche jedoch durch KLK8-Reduktion auf das Niveau wildtypischer Mäuse angehoben wurde. Zur Evaluation der ultrastrukturellen Schädigung der NVU diente die Untersuchung der BHS-Transportproteine MDR1, LRP1 und RAGE (Sweeney et al., 2019) im murinen Neokortex. Die AD-assoziierte Expressionsreduktion der Effluxtransporter MDR1 und LRP1 bestätigte sich auch in unserem Mausmodell, doch ihre defizitäre Expression konnte mittels *mKlk8-Knockdown* restituiert werden. Konträr dazu verhielten sich die neokortikalen Spiegel des Influxtransporters RAGE, dessen Expression via *mKlk8-Knockdown* reduziert wurde. Bemerkenswerterweise zeigte sich die positive Wirkung auf die LRP1- sowie RAGE-Expression nur in weiblichen Mäusen, womit erstmalig eine Geschlechtsspezifität detektiert wurde. Die Restitution physiologischer (KLK8-) Proteinspiegel scheint besonders erstrebenswert, da auch unphysiologisch erniedrigte Spiegel (hier *mKlk8-Knockdown* induziert) die MDR1-Expression in nicht-transgenen Mäusen kompromittierten.

Die Bestätigung der vielfach nachgewiesenen Gefäßaffektion im Rahmen der AD schafft eine zuverlässige Grundlage für die Interpretation unserer Ergebnisse. Somit lässt die Verbesserung aller untersuchten neurovaskulären Komponenten durch den *mKlk8-Knockdown* eine kausale Beteiligung von KLK8 an dieser Gefäßaffektion vermuten. Konkret trägt KLK8, durch Interferenz mit der BHS-Transportprotein-Expression, zur NVU-Dysfunktion bei. Unterstützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse eines vorangegangenen Projekts unserer Arbeitsgruppe, bei dem eine vierwöchige AK-vermittelte Blockade von KLK8 bereits positive Effekte auf die NVU vermitteln konnte. Diese zeigten sich jedoch in AD-erkrankten Mäusen nur für MDR1 signifikant, womit der langfristigen KLK8-Reduktion eine weitaus höhere Effektivität zukommt (Herring et al., 2016).

Dass die NVU nicht nur lokal eine wichtige Bedeutung im Rahmen der AD hat, bestätigt sich auch in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen. Aktuelle Studien zeigen, dass LRP1 und RAGE, neben der Vermittlung des A $\beta$ -Transports, auch weitere bedeutende Funktionen moderieren (Fan et al., 2019; Nikolakopoulou et al., 2021; Paudel et al., 2020;

Sweeney et al., 2019; Wan et al., 2015). Interessanterweise zeigt sich eine große Übereinstimmung der therapeutischen Effektivität einer LRP1-Restitution sowie RAGE-Blockade mit unserem *mKlk8-Knockdown*-Projekt. Reduktion des pathologischen KLK8-Exzesses erreichte, ebenso wie Restitution der LRP1- und RAGE-Spiegel, eine Verbesserung der NVU-Dysfunktion, der Plaque-Pathologie, der Neuroinflammation, der BACE1-Expression oder der Kognition (Burstein et al., 2018; Fan et al., 2019; Herring et al., 2021; Nikolakopoulou et al., 2021; Paudel et al., 2020; Sweeney et al., 2019; Wan et al., 2015). Diese Ergebnisse bestätigen weiter die Hypothese einer initialen Beteiligung von KLK8 an der AD-assoziierten NVU-Dysfunktion, indem sich KLK8 als vorgeschalteter Effektor des LRP1-Verlustes sowie der RAGE-vermittelten Schäden herauskristallisiert. Damit bietet die KLK8-Reduktion offensichtlich, durch Wiederherstellung der physiologischen BHS-Transportprotein-Expression, ein multifaktoriell bedingtes therapeutisches Potenzial im Rahmen der AD, von dem nicht nur die NVU profitiert.

## **5.2 Potenzielle Mechanismen der Kallikrein-8-Reduktion-vermittelten Erfolge an der NVU**

Angesichts der zahlreichen Hinweise einer initialen Beteiligung von KLK8 an der AD-assoziierten NVU-Dysfunktion stellt sich die Frage, welche Pathomechanismen dieser Schädigung zugrunde liegen. In Studien anderer Institute zeigte sich die LRP1-Expression im entzündlichen Milieu kompromittiert (Deane et al., 2004; Sweeney et al., 2019) und Folgen eines LRP1-Mangels konnten durch Inhibition von CypA revidiert werden (Nikolakopoulou et al., 2021). Zudem verbesserte der Einsatz von Ibuprofen die MDR1-Expression (Jia et al., 2020), was möglicherweise auf dessen antiphlogistische Wirkung zurückzuführen ist. Darüber hinaus verstärkt RAGE über zahlreiche inflammatorische Signalkaskaden die AD-Pathologie (Burstein et al., 2018; Paudel et al., 2020), womit das Immunsystem vermutlich Einfluss auf die Expression der BHS-Transporter nimmt. Interessanterweise vermittelt die Reduktion der KLK8-Level eine Modulation der Immunantwort (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021), die somit zur Verbesserung der Transportprotein-Expression beitragen könnte. Die simple Erklärung einer verminderten Entzündungsreaktion dürfte für KLK8-gerichtete

Therapien jedoch nicht angebracht sein, da zweifache Messungen unseres Instituts zwar eine phagozytotische Modifikation der Glia, aber keine Reduktion proinflammatorischer Marker nachweisen konnten (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021).

Mit EPHB2 beeinflusst KLK8 einen weiteren Modulator der Angiogenese (Adams et al., 1999; Herring et al., 2016; Xing et al., 2019). Über Induktion der Angiogenese (Xing et al., 2019), Förderung der BHS-Integrität (Sweeney et al., 2018a) sowie Reduktion der RAGE-Expression scheint EPHB2 maßgeblich an der Aufrechterhaltung der vaskulär vermittelten A $\beta$ -*Clearance* beteiligt zu sein (Xing et al., 2019). In Bezug auf KLK8 ist bekannt, dass KLK8 EPHB2 spaltet (Attwood et al., 2011; Prassas et al., 2015). Passend dazu konnten verminderte EPHB2-Spiegel, zeitlich nach dem KLK8-Exzess, sowohl bei AD-Patient:innen als auch bei transgenen Mäusen nachgewiesen werden (Herring et al., 2016). Für die AD könnte dies bedeuten, dass der KLK8-Exzess die EPHB2-Spiegel so weit reduziert, dass EPHB2 seine angioprotektive Wirkung nicht mehr vermitteln kann und die RAGE-Expression enthemmt wird. Eine Grundlage des Erfolgs KLK8-reduzierender Maßnahmen an der NVU könnte demnach der Erhalt von EPHB2 mit seiner angioprotektiven Wirkung sein. Auch für die Veränderungen der MDR1- sowie LRP1-Expression scheint der KLK8-Exzess der AD (Herring et al., 2021) verantwortlich zu sein. Ob ihre Restitution im Rahmen der KLK8-Reduktion ebenfalls im Zusammenhang mit dem Erhalt von EPHB2 steht, ist unbekannt.

Dass EPHB2 einer der wesentlichen Vermittler KLK8 moderierter Effekte sein könnte, zeigt sich auch in seiner Beteiligung an weiteren Facetten der AD-Pathologie. Über *FK506 Binding Protein-5* (FKBP5) ist EPHB2 an der Entstehung von Angst in der Amygdala mit verantwortlich (Attwood et al., 2011; Prassas et al., 2015). Ein Mangel an EPHB2 führt zu kompromittierter LTP, kognitiven Einbußen (Cissé et al., 2011) sowie Beeinträchtigung der neuronalen Plastizität (Münster et al., 2020). Nicht zuletzt scheint EPHB2 auch für die Mikroglia-vermittelte Phagozytose von A $\beta$  eine entscheidende Rolle zu spielen (Herring et al., 2016).

### 5.3 Kallikrein-8 als möglicher Initiator der Alzheimer-Pathologie

Die umfangreiche Verbesserung der NVU-Dysfunktion durch Reduktion der KLK8-Spiegel macht diese Protease zu einem vielversprechenden *Target* in der AD-Forschung. Dabei stellt sich die Frage, welche Funktion KLK8 in der Pathogenese der AD vermittelt. Es ist bereits bekannt, dass die zerebralen KLK8-Level sowohl bei AD-Patient:innen als auch im AD-Mausmodell bereits vor Auftreten der bekannten neuropathologischen Veränderungen exzessiv erhöht sind (Herring et al., 2016). Auch in Blut und Liquor AD-erkrankter Patient:innen ist bereits im Prodromalstadium (MCI) eine KLK8-Erhöhung nachweisbar (Teuber-Hanselmann et al., 2020).

Kongruent mit bestehenden Erkenntnissen (Herring et al., 2016) bestätigten sich auch in diesem Projekt, bereits zu Erkrankungsbeginn (P30), erhöhte KLK8-Level in transgenen Tieren (Herring et al., 2021). Trotz wiederholtem Nachweis der exzessiv gesteigerten KLK8-Expression ist deren Ursache weiterhin ungeklärt. Das Kallikrein-System wird durch verschiedenste Mechanismen wie Inhibitoren, pH-Änderungen, synaptische Aktivität oder auch Stress moduliert (Attwood et al., 2011; Prassas et al., 2015). Ob möglicherweise einer dieser Faktoren bei der AD zur Dysfunktion des KLK-Systems mit KLK8-Exzess beiträgt, bedarf weiterer Forschung.

Mit Reduktion der A $\beta$ -Pathologie wirkte sich der *mKlk8-Knockdown* positiv auf eine der zentralen Neuropathologien der AD aus (Herring et al., 2021; Kent et al., 2020). Ein Erklärungsansatz könnte die verbesserte A $\beta$ -*Clearance* durch Restitution der NVU sowie Förderung des glymphatischen Systems, als weiterem wichtigen gefäßassoziierten *Clearance*-Mechanismus, sein (Carare et al., 2020; Herring et al., 2021). Neben den Gefäßen trägt die gliale Phagozytose ebenfalls zur A $\beta$ -*Clearance* bei (Greenberg et al., 2020). Während die AD auch diesen Pfeiler der A $\beta$ -*Clearance* kompromittierte, führte die KLK8-Reduktion zu einem Funktionserhalt. Die (partielle) Wiederherstellung der Autophagie zeigte sich anhand ansteigender zerebraler Autophagiemarker wie *Autophagy Protein 5-12 Complex* (ATG5-12), *Autophagy Protein 5* (ATG5) und Beclin-1 in transgenen Mäusen. Auch die Phagozytosefähigkeit sowie die Resilienz verbesserten sich infolge des *mKlk8-Knockdowns*, was durch

Messung der *Secreted Phosphoprotein 1* (SPP1)- und *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* (TREM2)-Spiegel (in transgenen Mäusen) objektiviert wurde. Die verbesserte mikrogliale Resilienz blieb jedoch ohne Anstieg proinflammatorischer Marker wie Prostaglandin E Rezeptor 2 (PTGER2) oder TNF $\alpha$  (Herring et al., 2021), womit vornehmlich die protektiven Effekte der Immunantwort (in transgenen Mäusen) begünstigt wurden.

Via Restitution der aberranten KLK8-Expression wurden besonders die diffusen A $\beta$ -Plaques transgener Mäuse beeinflusst (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021), was auch eine Beteiligung von KLK8 an den initialen Prozessen der Amyloid-Kaskade vermuten lässt. Diese Vermutung bestätigte sich anhand verringerter amyloider APP-Prozessierung transgener Mäuse durch den *mKlk8-Knockdown*, objektiviert durch verminderte *C-Terminal Fragment Beta-* (CTF $\beta$ ) sowie A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel. Mit Nachweis reduzierter BACE1-Proteinlevel via *mKlk8-Knockdown* lieferten unsere Ergebnisse auch eine Erklärung für diese veränderte APP-Prozessierung in transgenen Mäusen (Herring et al., 2021). Verantwortlich dafür könnte die Beeinflussung von BACE1 durch KLK8 oder seine nachgeschalteten Effektoren sein (Burstein et al., 2018; Fan et al., 2019). Die von mir nachgewiesene erhöhte LRP1- und reduzierte RAGE-Expression sorgen sowohl für einen vermehrten Abbau (Fan et al., 2019) als auch eine verminderte Stimulation von BACE1 (Burstein et al., 2018; Paudel et al., 2020).

Die Folge expandierender A $\beta$ -Pathologie sowie der NVU-Dysfunktion im Rahmen der AD ist eine progrediente Neurodegeneration (Alzheimer's Association, 2019; Sweeney et al., 2019). Entsprechend lässt die Revision dieser Pathologien auch eine neuroprotektive Wirkung der KLK8-Reduktion vermuten. Ebendiese bestätigte sich mit dem Nachweis erhöhter Neuroplastizitätsmarker wie Synaptophysin (SYP), *Growth Associated Protein 43* (GAP43), *Activity Regulated Cytoskeletal-associated Protein* (ARC) sowie der neuroplastizitätsassoziierten KLK8-Substrate EPHB2, L1CAM und Fibronectin (FN) in transgenen Tieren. Auch die defizitäre Neurogenese und Neurodifferenzierung konnten via *mKlk8-Knockdown* ausgeglichen werden, wofür der vermehrte Nachweis *Doublecortin*-positiver Neurone genutzt wurde. Selbst morphologisch war der positive Einfluss der KLK8-Reduktion auf die Neuroplastizität

AD-erkrankter Mäuse detektierbar, da die Dichte dendritischer Dornfortsätze und die Dendritenkomplexität signifikant erhöht wurden (Herring et al., 2021).

Auch die Tau-Pathologie, als weitere zentrale Neuropathologie der AD, konnte durch den *mKlk8-Knockdown* verbessert werden. Messungen im entorhinalen Kortex transgener Mäuse bestätigten einen verminderten Anteil phosphorylierten Taus am gesamt-Tau, doch zeigte sich die Tau-Dephosphorylierung selbst nicht von der KLK8-Reduktion beeinflusst (Herring et al., 2021).

Die multimodale Revision neuropathologischer Veränderungen dürfte auch Grundlage für die Verbesserung des klinischen *Outcomes* der transgenen Mäuse mit *mKlk8-Knockdown* sein. Mit Reduktion kognitiver Defizite und Ängstlichkeit konnte die führende Symptomatik der AD abgemildert werden (Herring et al., 2021).

Trotz der weit verbreiteten Expression von KLK8 (Prassas et al., 2015; Shimizu-Okabe et al., 2001) ging dessen Reduktion mit einem sehr geringen Nebenwirkungsspektrum einher. Es zeigten sich lediglich bei gesunden Mäusen beider Geschlechter zerebral vereinzelt negative Effekte in Form verminderter EPHB2-, MDR1- und Beclin-1-Spiegel sowie eine reduzierte Dichte dendritischer Dornfortsätze in gesunden Männchen. Extrazerebral und auch Verhaltens-phänologisch konnten keinerlei Schäden detektiert werden, obwohl bereits in der Embryonalentwicklung die KLK8-Spiegel vermindert waren (Herring et al., 2021). Damit lässt sich ein breites therapeutisches Fenster potenzieller KLK8-reduzierender Therapeutika (wie Antikörper) vermuten, deren Einsatz sich durch gute Verträglichkeit auszeichnen könnte.

Die experimentelle Reduktion pathologisch alterierter KLK8-Level mittels 4-wöchiger Antikörper-Applikation hatte bereits in einem vorangegangenen Projekt eine ähnlich umfangreiche Modifikation der AD-Pathologie erreicht (Herring et al., 2016). Im Vergleich zur kurzzeitigen KLK8-Inhibition profitierten die AD-erkrankten Mäuse noch stärker auf den Gebieten der NVU-Dysfunktion sowie der Neuroplastizität vom *mKlk8-Knockdown*, während lediglich im Bereich der Tau-Pathologie eine geringere Effektivität erreicht werden konnte (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021).

Die Bestätigung der protektiven Wirkung via KLK8-Reduktion sowie der erneute Nachweis bereits früh erhöhter KLK8-Spiegel im Kontext der AD legen die Vermutung nahe, dass der KLK8-Exzess an den kausalen Prozessen der AD-Pathogenese beteiligt ist.

#### **5.4 Die Kallikrein-8-Expression zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede im Rahmen der AD**

Von Demenzerkrankungen, wie der AD, sind besonders Frauen betroffen (Nichols et al., 2019). Sie weisen zudem eine ausgeprägtere KLK8-Elevation (Keyvani et al., 2018) und stärkere neuropathologische- sowie kognitive Veränderungen auf (Nebel et al., 2018); Ergebnisse, die sich auch in weiblichen Mäusen bestätigen ließen. Darüber hinaus leiden weibliche Mäuse auch an einer deutlich ausgeprägteren AD-assoziierten NVU-Dysfunktion. Besonders kompromittiert ist der A $\beta$ -Efflux der BHS (Keyvani et al., 2018), wofür die von mir nachgewiesene LRP1-Minderexpression (sowie die, in meinem Projekt jedoch nicht signifikante, RAGE-Erhöhung) in weiblich-transgenen Mäusen einen molekularen Erklärungsansatz liefern könnte. Dass vermutlich auch hierfür die erhöhten KLK8-Spiegel maßgeblich verantwortlich sind, zeigte sich anhand der Restitution der weiblichen NVU-Dysfunktion via KLK8-Reduktion, während die männliche Angiogenese, bei *per se* geringerer KLK8-Expression (Herring et al., 2021; Keyvani et al., 2018), unbeeinflusst blieb. Die multimodale Restitution der NVU-Dysfunktion in unserem Projekt könnte auch eine Erklärung für die, besonders in Weibchen verbesserte Neuroplastizität sein, welche anhand erhöhter FN-Proteinlevel sowie der Dichte dendritischer Dornfortsätze objektiviert wurde (Herring et al., 2021).

Obwohl sich der protektive Effekt der KLK8-Reduktion bei Weibchen noch ausgeprägter darstellte, zeigte sich der Großteil der *mKlk8-Knockdown*-vermittelten Erfolge geschlechtsunabhängig (Herring et al., 2021).

Die Ursache des KLK8-Exzesses im Rahmen der AD ist bisher noch ungeklärt, doch für die erhöhten KLK8-Level in weiblichen Mäusen (Herring et al., 2021; Keyvani et al., 2018) könnte die Östrogen-vermittelte KLK8-Induktion eine Erklärung darstellen. Männliche Organismen scheinen einen AD-protektiven Hormonhaushalt zu

besitzen. Während niedrige Dosen Testosterons die mikrogliale Funktion verbessern, vermittelt Östrogen erst in hoher Dosierung ähnliche Erfolge. Somit könnte Östrogen, durch Induktion von KLK8, eine Grundvoraussetzung zur Entstehung der AD schaffen (Keyvani et al., 2018), während der postmenopausale Östrogenmangel (Nebel et al., 2018) gleichzeitig die AD-Resilienz-Mechanismen kompromittiert (Keyvani et al., 2018).

### **5.5 Diagnostisches sowie therapeutisches Potenzial von Kallikrein-8**

Der mehrfache Nachweis multimodal verbesserter AD-Pathologie via KLK8-Reduktion (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021) wirft die Frage auf, welche Effektivität ein solcher Therapieansatz tatsächlich bieten könnte. Mit dem RAGE-Antagonisten, Azeliragon, hat es eine BHS-Transporter-gerichtete AD-Therapie bereits in klinische Phase III Studien geschafft (Burstein et al., 2018; Sweeney et al., 2019). Die klinische Erprobung verdeutlicht, dass bereits die Restitution eines BHS-Transportproteins im Kontext der AD eine ausreichend therapeutische Effektivität besitzen könnte. Beachtet man, dass eine KLK8-Reduktion vergleichbare Erfolge wie Azeliragon (im Mausmodell) vermitteln konnte (Burstein et al., 2018; Herring et al., 2021), doch darüber hinaus noch zahlreiche weitere Signalkaskaden erfolgreich adressierte, birgt KLK8 möglicherweise große Hoffnung für zukünftige AD-Therapien. Multimodale Effektivität durch Reduktion nur eines Zielmoleküls, KLK8 (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021), könnte einen großen Erfolg im Kontext der AD-Therapie bedeuten. Attraktiv wird dieser potenzielle Therapieansatz auch durch seine hohe Effektivität bei geringem Auftreten unerwünschter Wirkungen. Gleichzeitig stellt die Verbesserung der kognitiven Leistung (im Mausmodell) (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021) eine wichtige Grundlage klinischer Erfolge dieses neuartigen Therapieansatzes dar.

Eine klinische Nutzung unserer Erkenntnisse, im Sinne einer krankheitsmodifizierenden Therapie, wäre zukünftig in Form intravenös applizierter Antikörper denkbar. Diese spezifisch abgestimmte Therapieform revolutionierte die moderne Medizin (Rajewsky, 2019; Salles et al., 2017) und bietet auch Hoffnung für die Therapie bisher unheilbarer Krankheiten, wie der AD. Neben der therapeutischen Nutzung bergen Antikörper auch ein diagnostisches Potenzial, indem mit ihrer Hilfe biologische Proben

auf spezifische Moleküle hin untersucht werden können (Rajewsky, 2019). In Bezug auf KLK8 könnte damit die Detektion präklinisch erhöhter KLK8-Spiegel in Blut und Liquor (Teuber-Hanselmann et al., 2020) zur Identifizierung AD-Erkrankter genutzt werden, um ihnen gezielt KLK8-reduzierende Therapien zukommen zu lassen.

Ob zukünftig die Indikationsstellung für personalisierte AD-Therapien mittels KLK8-Reduktion lediglich einer Blutentnahme bedarf, bleibt anhand weiterführender Studien zu evaluieren. Gleichmaßen erfordert die Überprüfung des therapeutischen Potenzials von KLK8 eine Verifizierung beim Menschen. Die Spezifität der AK, deren Wirksamkeit und Sicherheit sowie adäquate Dosierungen müssen erprobt werden, um dem wachsenden medizinischen Problem der AD möglicherweise zukünftig etwas Einhalt gebieten zu können.

## 5.6 Einschränkungen, Stärken und Bedeutung der Arbeit

Wie sind nun die Ergebnisse unseres Projekts in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen? Der Großteil der Forschung, wie auch unser Mausmodell, basiert auf Modellen der EOAD (Gordon et al., 2018), wohingegen die Mehrheit der Patient:innen von der LOAD betroffen ist (Reitz and Mayeux, 2014). Der Pathomechanismus der verbreiteten LOAD ist noch nicht hinreichend geklärt und scheint multifaktoriell bedingt zu sein (Kunkle et al., 2019; Reitz and Mayeux, 2014), weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse begrenzt ist. Bekannt ist jedoch, dass die kompromittierte *Clearance* eine wichtige Komponente der LOAD-Pathomechanismen darstellt (Tarasoff-Conway et al., 2015), womit der Nachweis verbesserter *Clearance*-Mechanismen (Herring et al., 2021) die KLK8-Reduktion zu einem interessanten potenziellen Therapieansatz macht.

Durch die genetische Modifikation im Rahmen dieses Projektes (der erfolgreiche *mKlk8-Knockdown* wurde durch den Nachweis 50%iger KLK8-Reduktion im Immunoblot und der *real-time* PCR bestätigt (Herring et al., 2021)) sind Schlussfolgerungen zum therapeutischen Potenzial der KLK8-Reduktion limitiert. Dafür wurde die Problematik unerwünschter Interaktionen, wie sie bei KLK-AK-gerichteter Forschung besteht (Herring et al., 2016; Prassas et al., 2015), umgangen und die Veränderungen der AD-ähnlichen Pathologie (Herring et al., 2021) können der aberranten KLK8-Expression

zugeschrieben werden. Die Besonderheit unserer Ergebnisse liegt im Nachweis der Beteiligung von nur einer Protease, KLK8, an verschiedensten Pathomechanismen der AD. Damit liefern wir einen wichtigen Beitrag zur Grundlagenforschung der AD, an deren Pathogenese KLK8 maßgeblich beteiligt zu sein scheint. Die Lage auf Chromosom 19, auf dem nachweislich zahlreiche weitere AD-Risikogene lokalisiert sind (Bao et al., 2016; Kunkle et al., 2019; Prassas et al., 2015), unterstützt weiter diese Hypothese. Zudem zeigt sich, trotz intensiver Forschung, in den letzten Jahrzehnten kein klinisch überzeugender Fortschritt in der Alzheimer-Therapie, weshalb die weit verbreitete Amyloid-Hypothese zunehmend in die Kritik gerät (Carare et al., 2020; Dunn et al., 2021; Honig et al., 2018) und Alternativhypothesen überprüft werden (Huang et al., 2020; Nikolakopoulou et al., 2021; Sweeney et al., 2019).

Mit den Erfolgen des vorangegangenen AK-Projekts bestehen jedoch bereits Hinweise eines therapeutischen Effekts KLK8-gerichteter AK-Therapien (Herring et al., 2016). Auch wenn die zahlreichen Erfolge der KLK8-Reduktion bisher lediglich im Tiermodell und an Zellkulturen erzielt wurden, scheint eine *Bench to Bedside* Translation, durch die bei beiden Spezies erhöhten KLK8-Spiegel sowie den wiederholten Nachweis der positiven Wirkung (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021), denkbar zu sein.

Die Dringlichkeit neuer AD-Therapien zeigt sich, neben der Notwendigkeit zur Linderung der menschlichen Leiden, auch in sozioökonomischen Rechnungen. Nach diesen könnte bereits die Verzögerung des Krankheitsbeginns um 5 Jahre die Anzahl der Erkrankten sowie die Kosten fast halbieren (Sperling et al., 2011).

## 5.7 Schlussfolgerung

Mit KLK8 präsentieren wir somit ein Protein, welches verschiedenste Aspekte der AD-Pathologie beeinflusst und möglicherweise kausal an dessen Pathogenese beteiligt ist. Konkret konnte ich mit dieser Arbeit KLK8 als einen Effektor der AD-assoziierten NVU-Dysfunktion bestätigen, dessen experimentelle Proteinreduktion eine Restitution dieser Dysfunktion vermittelt. Damit liefern wir einen wichtigen Beitrag zur Grundlagenforschung der AD, dessen klinische Anwendbarkeit durch Folgestudien dringend weiter überprüft werden sollte.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimer-Krankheit (AD) geht mit einem Exzess der Protease Kallikrein-8 (KLK8) in Gehirn, Blut und Liquor einher, deren experimentelle Reduktion mittels 4-wöchiger Antikörper-Applikation bei transgenen (tg) Mäusen umfangreiche Verbesserungen erzielte. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss die KLK8-Reduktion mittels *mKlk8-Knockdown* auf die AD-pathologischen Veränderungen der neurovaskulären Einheit (NVU) bei beiden Geschlechtern im tg-Mausmodell der AD hat.

An einem TgCRND8-Mausmodell der AD erfolgte die stereologische Quantifizierung Laminin gefärbter Blutgefäße in Hippokampus, Neokortex sowie Basalganglien geschlechtsgetrennt an folgenden Experimentalgruppen (gesund: kein humanes *Amyloid Precursor Protein* (*hAPP*<sup>-/-</sup>), AD-erkrankt: *hAPP*<sup>+/+</sup>, physiologische KLK8-Level: *mKlk8*<sup>+/+</sup>, *mKlk8-Knockdown*: *mKlk8*<sup>+/-</sup>). Mittels Western Blot Analysen neokortikaler Hirnlysate fand die Messung der Proteinlevel der A $\beta$ -Transportproteine *Multidrug Resistance Protein 1B* (MDR1), *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1* (LRP1) und *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) an den gleichen Versuchsgruppen statt.

Wir konnten zeigen, dass der *mklk8-Knockdown* der AD-assozierten NVU-Dysfunktion entgegenwirkt, indem in tg-Mäusen sowohl die hippokampale Gefäßdichte als auch die neokortikale Effluxtransporter-Expression (MDR1, LRP1) erhöht wurden, bei gleichzeitig reduzierter Expression des Influxtransporters RAGE. Der erstmalige Nachweis geschlechtsspezifischer Effekte an der NVU basiert auf der ausschließlichen Verbesserung der LRP1- und RAGE-Expression in tg-Weibchen. Auf gesunde Mäuse hatte der *mKlk8-Knockdown*, abgesehen von verringerten neokortikalen MDR1-Spiegeln, keine negativen Auswirkungen (an der NVU).

Meine Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass der KLK8-Exzess für die AD-assozierte NVU-Dysfunktion verantwortlich ist. Mit dem zusätzlichen Nachweis multimodaler Restitution der AD-Pathologie via *mKlk8-Knockdown*, bestätigt unsere Arbeitsgruppe KLK8 als potenziellen Initiator der AD, womit wir einen wichtigen Beitrag zur AD-Grundlagenforschung leisten. Demnach bildet KLK8 ein vielversprechendes *Target* zukünftiger AD-Therapien, dessen klinischer Erfolg dringend evaluiert werden sollte.

## 7 SUMMARY

Excess of the protease Kallikrein-8 (KLK8) has been detected in blood, cerebrospinal fluid and brain of patients suffering from Alzheimer's disease (AD). Antibody mediated KLK8 reduction for 4 weeks was able to reduce multiple AD-related pathologies including neurovascular dysfunction. Due to this, this work focusses on the effects of genetic KLK8 reduction on the neurovascular unit (NVU) of both sexes in a transgenic (tg) mouse model of AD.

In a TgCRND8 mouse model of AD the NVU was examined in the following experimental groups (non-tg: *hAPP*<sup>-/-</sup> (abbreviation for: human Amyloid Precursor Protein), tg: *hAPP*<sup>+/+</sup>, physiologic KLK8-levels: *mKlk8*<sup>+/+</sup>, *mKlk8-Knockdown*: *mKlk8*<sup>+/-</sup>) gender-segregated. To evaluate the neurovascular state stereological quantification of the vessel density was done on laminin immunostained coronal sections in hippocampus, neocortex and basal ganglia. The detection of the cerebral A $\beta$  transporters (Multidrug Resistance Protein 1B (MDR1), Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) and Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)) was performed on neocortical brain homogenates by western blot analysis.

We showed that *mklk8-Knockdown* counteracts NVU dysfunction in transgenic mice. The *mklk8-Knockdown* elevated hippocampal vessel density as well as neocortical A $\beta$  efflux transporter expression (MDR1, LRP1) in transgenics to levels indistinguishable from wildtypes, whereas the expression of the neocortical influx transporter RAGE was reduced in transgenics. First time evidence for gender-related effects on the NVU was based upon significant results for LRP1 and RAGE exclusively in female transgenics. Adverse effects on non-transgenics were restricted to reduced neocortical MDR1 expression.

Our results indicate a causative role of KLK8 on the AD-related NVU dysfunction. Further research of our team confirmed multimodal positive effects of KLK8 reduction on transgenic mice, leading to the hypothesis that KLK8 has a causal role in AD pathogenesis.

In conclusion, our project contributes to the basic research in AD, confirming KLK8 as a potentially new and important player in the pathomechanism of this neurodegenerative disease, whose clinical benefit on humans should be evaluated.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & development* 13, 295-306.
2. Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5562-5566.
3. Alzheimer's Association (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 15, 321-387.
4. Alzheimer's Association (2020). 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 16, 391-460.
5. Alzheimer's Disease International 2019: World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia, Online-Publikation; <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019.pdf>; 17.03.2020.
6. Attwood, B.K., Bourgognon, J.-M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., and Pawlak, R. (2011). Neuropilin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
7. Bao, J., Wang, X.-j., and Mao, Z.-f. (2016). Associations Between Genetic Variants in 19p13 and 19q13 Regions and Susceptibility to Alzheimer Disease: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 22, 234-243.
8. Bennett, R.E., Hu, M., Fernandes, A., Perez-Rando, M., Robbins, A., Kamath, T., Dujardin, S., and Hyman, B.T. (2020). Tau reduction in aged mice does not impact Microangiopathy. *Acta Neuropathol Commun* 8, 137-137.
9. Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267, 546-554.
10. Burstein, A.H., Sabbagh, M., Andrews, R., Valcarce, C., Dunn, I., and Altstiel, L. (2018). Development of Azeliragon, an Oral Small Molecule Antagonist of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts, for the Potential Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 5, 149-154.
11. Carare, R.O., Aldea, R., Agarwal, N., Bacskai, B.J., Bechman, I., Boche, D., Bu, G., Bulters, D., Clemens, A., Counts, S.E., de Leon, M., Eide, P.K., Fossati, S., Greenberg, S.M., Hamel, E., Hawkes, C.A., Koronyo-Hamaoui, M., Hainsworth, A.H., Holtzman, D., Ihara, M., Jefferson, A., Kalaria, R.N., Kipps, C.M., Kanninen, K.M., Leinonen, V.,

McLaurin, J., Miners, S., Malm, T., Nicoll, J.A.R., Piazza, F., Paul, G., Rich, S.M., Saito, S., Shih, A., Scholtzova, H., Snyder, H., Snyder, P., Thormodsson, F.R., van Veluw, S.J., Weller, R.O., Werring, D.J., Wilcock, D., Wilson, M.R., Zlokovic, B.V., and Verma, A. (2020). Clearance of interstitial fluid (ISF) and CSF (CLIC) group-part of Vascular Professional Interest Area (PIA): Cerebrovascular disease and the failure of elimination of Amyloid- $\beta$  from the brain and retina with age and Alzheimer's disease-Opportunities for Therapy. *Alzheimers Dement (Amst)* 12, e12053.

12. Cavazzoni, P. 2021: FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. U.S. Food and Drug Administration, Online-Publikation; <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>; 30.10.2021.

13. Chishti, M.A., Yang, D.-S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., and French, J. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562-21570.

14. Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., Ho, K., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 469, 47-52.

15. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., and Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 695-698.

16. Davies, B., Kearns, I.R., Ure, J., Davies, C.H., and Lathe, R. (2001). Loss of hippocampal serine protease BSP1/neurosin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 21, 6993-7000.

17. Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., and Zlokovic, B. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9, 907-913.

18. Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J., Van Nostrand, W.E., and Zlokovic, B.V. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43, 333-344.

19. Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118, 4002-4013.

20. Deane, R., Singh, I., Sagare, A.P., Bell, R.D., Ross, N.T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R.J., Thiyagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A.E.,

- Miller, B.L., and Zlokovic, B.V. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* *122*, 1377-1392.
21. Deuschl, G., Maier, W., Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, P.u.N., and Neurologie, D.G.f. 2016: S3-Leitlinie "Demenzen". Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Online-Publikation; [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/038-0131\\_S3-Demenzen-2016-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-0131_S3-Demenzen-2016-07.pdf); 14.09.2020.
22. Dunn, B., Stein, P., and Cavazzoni, P. (2021). Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease—the FDA’s Perspective. *JAMA Internal Medicine* *181*, 1276-1278.
23. Fan, Y.G., Guo, T., Han, X.R., Liu, J.L., Cai, Y.T., Xue, H., Huang, X.S., Li, Y.C., Wang, Z.Y., and Guo, C. (2019). Paricalcitol accelerates BACE1 lysosomal degradation and inhibits calpain-1 dependent neuronal loss in APP/PS1 transgenic mice. *EBioMedicine* *45*, 393-407.
24. Gordon, B.A., Blazey, T.M., Su, Y., Hari-Raj, A., Dincer, A., Flores, S., Christensen, J., McDade, E., Wang, G., Xiong, C., Cairns, N.J., Hassenstab, J., Marcus, D.S., Fagan, A.M., Jack, C.R., Jr., Hornbeck, R.C., Paumier, K.L., Ances, B.M., Berman, S.B., Brickman, A.M., Cash, D.M., Chhatwal, J.P., Correia, S., Förster, S., Fox, N.C., Graff-Radford, N.R., la Fougère, C., Levin, J., Masters, C.L., Rossor, M.N., Salloway, S., Saykin, A.J., Schofield, P.R., Thompson, P.M., Weiner, M.M., Holtzman, D.M., Raichle, M.E., Morris, J.C., Bateman, R.J., and Benzinger, T.L.S. (2018). Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *The Lancet Neurology* *17*, 241-250.
25. Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., and van Veluw, S.J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* *16*, 30-42.
26. Herring, A., Münster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger, T., Teuber-Hanselmann, S., and Keyvani, K. (2016). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimers Dement* *12*, 1273-1287.
27. Herring, A., Kurapati, N.K., Krebs, S., Grammon, N., Scholz, L.M., Voss, G., Miah, M.R., Budny, V., Mairinger, F., Haase, K., Teuber-Hanselmann, S., Döbersalske, C., Schramm, S., Jöckel, K.H., Münster, Y., and Keyvani, K. (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* *47*, 611-624.
28. Herz, J., Hamann, U., Røge, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *The EMBO journal* *7*, 4119-4127.

29. Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the Hippokampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.
30. Honig, L.S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., Case, M., Dean, R.A., Hake, A., Sundell, K., Poole Hoffmann, V., Carlson, C., Khanna, R., Mintun, M., DeMattos, R., Selzler, K.J., and Siemers, E. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine* 378, 321-330.
31. Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Denning, T., Findlay, D., Holmes, C., Hughes, A., Jacoby, R., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Passmore, P., Sheehan, B., Juszczak, E., Katona, C., Hills, R., Knapp, M., Ballard, C., Brown, R., Banerjee, S., Onions, C., Griffin, M., Adams, J., Gray, R., Johnson, T., Bentham, P., and Phillips, P. (2012). Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 366, 893-903.
32. Huang, L.K., Chao, S.P., and Hu, C.J. (2020). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of biomedical science* 27, 18.
33. Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Thies, B., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., and Montine, T.J. (2012). National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 8, 1-13.
34. Jack, C.R., Jr., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., and Contributors (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 14, 535-562.
35. Jia, Y., Wang, N., Zhang, Y., Xue, D., Lou, H., and Liu, X. (2020). Alteration in the Function and Expression of SLC and ABC Transporters in the Neurovascular Unit in Alzheimer's Disease and the Clinical Significance. *Aging Dis* 11, 390-404.
36. Kent, S.A., Spires-Jones, T.L., and Durrant, C.S. (2020). The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta neuropathologica* 140, 417-447.
37. Keyvani, K., Münster, Y., Kurapati, N.K., Rubach, S., Schönborn, A., Kocakavuk, E., Karout, M., Hammesfahr, P., Wang, Y.-C., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann, S., and Herring, A. (2018). Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 28, 947-964.

38. Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C.L., Schwab, M.E., and Hermann, D.M. (2010). Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 969-984.
39. Konar, A., and Thakur, M.K. (2015). Neuropsin Expression Correlates with Dendritic Marker MAP2c Level in Different Brain Regions of Aging Mice. *Mol Neurobiol* 51, 1130-1138.
40. Kunkle, B.W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J.C., Damotte, V., Naj, A.C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S.J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E.R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K.L., Moreno-Grau, S., Ollaso, R., Raybould, R., Chen, Y., Kuzma, A.B., Hiltunen, M., Morgan, T., Ahmad, S., Vardarajan, B.N., Epelbaum, J., Hoffmann, P., Boada, M., Beecham, G.W., Garnier, J.-G., Harold, D., Fitzpatrick, A.L., Valladares, O., Moutet, M.-L., Gerrish, A., Smith, A.V., Qu, L., Bacq, D., Denning, N., Jian, X., Zhao, Y., Del Zompo, M., Fox, N.C., Choi, S.-H., Mateo, I., Hughes, J.T., Adams, H.H., Malamon, J., Sanchez-Garcia, F., Patel, Y., Brody, J.A., Dombroski, B.A., Naranjo, M.C.D., Daniilidou, M., Eiriksdottir, G., Mukherjee, S., Wallon, D., Uphill, J., Aspelund, T., Cantwell, L.B., Garzia, F., Galimberti, D., Hofer, E., Butkiewicz, M., Fin, B., Scarpini, E., Sarnowski, C., Bush, W.S., Meslage, S., Kornhuber, J., White, C.C., Song, Y., Barber, R.C., Engelborghs, S., Sordon, S., Voijnovic, D., Adams, P.M., Vandenberghe, R., Mayhaus, M., Cupples, L.A., Albert, M.S., De Deyn, P.P., Gu, W., Himali, J.J., Beekly, D., Squassina, A., Hartmann, A.M., Orellana, A., Blacker, D., Rodriguez-Rodriguez, E., Lovestone, S., Garcia, M.E., Doody, R.S., Munoz-Fernandez, C., Sussams, R., Lin, H., Fairchild, T.J., Benito, Y.A., Holmes, C., Karamujic-Comic, H., Frosch, M.P., Thonberg, H., Maier, W., Roshchupkin, G., Ghetti, B., Giedraitis, V., Kawalia, A., Li, S., Huebinger, R.M., Kilander, L., Moebus, S., Hernandez, I., Kamboh, M.I., Brundin, R., Turton, J., Yang, Q., Katz, M.J., Concari, L., Lord, J., Beiser, A.S., Keene, C.D., Helisalmi, S., Kloszewska, I., Kukull, W.A., Koivisto, A.M., Lynch, A., Tarraga, L., Larson, E.B., Haapasalo, A., Lawlor, B., Mosley, T.H., Lipton, R.B., Solfrizzi, V., Gill, M., Longstreth, W.T., Jr., Montine, T.J., Frisardi, V., Diez-Fairen, M., Rivadeneira, F., Petersen, R.C., Deramecourt, V., Alvarez, I., Salani, F., Ciarabella, A., Boerwinkle, E., Reiman, E.M., Fievet, N., Rotter, J.I., Reisch, J.S., Hanon, O., Cupidi, C., Andre Uitterlinden, A.G., Royall, D.R., Dufouil, C., Maletta, R.G., de Rojas, I., Sano, M., Brice, A., Cecchetti, R., George-Hyslop, P.S., Ritchie, K., Tsolaki, M., Tsuang, D.W., Dubois, B., Craig, D., Wu, C.-K., Soininen, H., Avramidou, D., Albin, R.L., Fratiglioni, L., Germanou, A., Apostolova, L.G., Keller, L., Koutroumani, M., Arnold, S.E., Panza, F., Gkatzima, O., Asthana, S., Hannequin, D., Whitehead, P., Atwood, C.S., Caffarra, P., Hampel, H., Quintela, I., Carracedo, A., Lannfelt, L., Rubinsztein, D.C., Barnes, L.L., Pasquier, F., Frölich, L., Barral, S., McGuinness, B., Beach, T.G., Johnston, J.A., Becker, J.T., Passmore, P., Bigio, E.H., Schott, J.M., Bird, T.D., Warren, J.D., Boeve, B.F., Lupton, M.K., Bowen, J.D., Proitsi, P., Boxer, A., Powell, J.F., Burke, J.R., Kauwe, J.S.K., Burns, J.M., Mancuso, M., Buxbaum, J.D., Bonuccelli, U., Cairns, N.J., McQuillin, A., Cao, C., Livingston, G., Carlson, C.S., Bass, N.J., Carlsson, C.M., Hardy, J., Carney, R.M., Bras, J., Carrasquillo, M.M., Guerreiro, R., Allen, M., Chui, H.C., Fisher, E., Masullo, C., Crocco, E.A., DeCarli, C., Bisceglia, G., Dick, M., Ma, L., Duara, R., Graff-Radford, N.R., Evans, D.A., Hodges, A., Faber, K.M., Scherer, M., Fallon, K.B., Riemenschneider, M., Fardo, D.W., Heun, R., Farlow, M.R., Kölsch, H., Ferris, S., Leber, M., Foroud, T.M.,

Heuser, I., Galasko, D.R., Giegling, I., Gearing, M., Hüll, M., Geschwind, D.H., Gilbert, J.R., Morris, J., Green, R.C., Mayo, K., Growdon, J.H., Feulner, T., Hamilton, R.L., Harrell, L.E., Dricchel, D., Honig, L.S., Cushion, T.D., Huentelman, M.J., Hollingworth, P., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Marshall, R., Jarvik, G.P., Meggy, A., Abner, E., Menzies, G.E., Jin, L.-W., Leonenko, G., Real, L.M., Jun, G.R., Baldwin, C.T., Grozeva, D., Karydas, A., Russo, G., Kaye, J.A., Kim, R., Jessen, F., Kowall, N.W., Vellas, B., Kramer, J.H., Vardy, E., LaFerla, F.M., Jöckel, K.-H., Lah, J.J., Dichgans, M., Leverenz, J.B., Mann, D., Levey, A.I., Pickering-Brown, S., Lieberman, A.P., Klopp, N., Lunetta, K.L., Wichmann, H.E., Lyketsos, C.G., Morgan, K., Marson, D.C., Brown, K., Martiniuk, F., Medway, C., Mash, D.C., Nöthen, M.M., Masliah, E., Hooper, N.M., McCormick, W.C., Daniele, A., McCurry, S.M., Bayer, A., McDavid, A.N., Gallacher, J., McKee, A.C., van den Bussche, H., Mesulam, M., Brayne, C., Miller, B.L., Riedel-Heller, S., Miller, C.A., Miller, J.W., Al-Chalabi, A., Morris, J.C., Shaw, C.E., Myers, A.J., Wiltfang, J., O'Bryant, S., Olichney, J.M., Alvarez, V., Parisi, J.E., Singleton, A.B., Paulson, H.L., Collinge, J., Perry, W.R., Mead, S., Peskind, E., Cribbs, D.H., Rossor, M., Pierce, A., Ryan, N.S., Poon, W.W., Nacmias, B., Potter, H., Sorbi, S., Quinn, J.F., Sacchinelli, E., Raj, A., Spalletta, G., Raskind, M., Caltagirone, C., Bossù, P., Orfei, M.D., Reisberg, B., Clarke, R., Reitz, C., Smith, A.D., Ringman, J.M., Warden, D., Roberson, E.D., Wilcock, G., Rogaeva, E., Bruni, A.C., Rosen, H.J., Gallo, M., Rosenberg, R.N., Ben-Shlomo, Y., Sager, M.A., Mecocci, P., Saykin, A.J., Pastor, P., Cuccaro, M.L., Vance, J.M., Schneider, J.A., Schneider, L.S., Slifer, S., Seeley, W.W., Smith, A.G., Sonnen, J.A., Spina, S., Stern, R.A., Swerdlow, R.H., Tang, M., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Van Deerlin, V.M., Van Eldik, L.J., Vinters, H.V., Vonsattel, J.P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K.A., Wilhelmsen, K.C., Williamson, J., Wingo, T.S., Woltjer, R.L., Wright, C.B., Yu, C.-E., Yu, L., Saba, Y., Pilotto, A., Bullido, M.J., Peters, O., Crane, P.K., Bennett, D., Bosco, P., Coto, E., Boccardi, V., De Jager, P.L., Lleo, A., Warner, N., Lopez, O.L., Ingelsson, M., Deloukas, P., Cruchaga, C., Graff, C., Gwilliam, R., Fornage, M., Goate, A.M., Sanchez-Juan, P., Kehoe, P.G., Amin, N., Ertekin-Taner, N., Berr, C., DeBette, S., Love, S., Launer, L.J., Younkin, S.G., Dartigues, J.-F., Corcoran, C., Ikram, M.A., Dickson, D.W., Nicolas, G., Champion, D., Tschanz, J., Schmidt, H., Hakonarson, H., Clarimon, J., Munger, R., Schmidt, R., Farrer, L.A., Van Broeckhoven, C., C O'Donovan, M., DeStefano, A.L., Jones, L., Haines, J.L., Deleuze, J.-F., Owen, M.J., Gudnason, V., Mayeux, R., Escott-Price, V., Psaty, B.M., Ramirez, A., Wang, L.-S., Ruiz, A., van Duijn, C.M., Holmans, P.A., Seshadri, S., Williams, J., Amouyel, P., Schellenberg, G.D., Lambert, J.-C., Pericak-Vance, M.A., Alzheimer Disease Genetics, C., European Alzheimer's Disease, I., Cohorts for, H., Aging Research in Genomic Epidemiology, C., Genetic, Environmental Risk in Ad/Defining Genetic, P., and Environmental Risk for Alzheimer's Disease, C. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nature genetics* 51, 414-430.

41. Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001). beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 76, 1121-1128.

42. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

43. Morris, A.W., Sharp, M.M., Albargothy, N.J., Fernandes, R., Hawkes, C.A., Verma, A., Weller, R.O., and Carare, R.O. (2016). Vascular basement membranes as pathways for the passage of fluid into and out of the brain. *Acta neuropathologica* *131*, 725-736.
44. Münster, Y., Keyvani, K., and Herring, A. (2020). Inhibition of excessive kallikrein-8 improves neuroplasticity in Alzheimer's disease mouse model. *Exp Neurol* *324*, 113115.
45. Nebel, R.A., Aggarwal, N.T., Barnes, L.L., Gallagher, A., Goldstein, J.M., Kantarci, K., Mallampalli, M.P., Mormino, E.C., Scott, L., Yu, W.H., Maki, P.M., and Mielke, M.M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement* *14*, 1171-1183.
46. Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* *267*, 14998-15004.
47. Nichols, E., Szeke, C.E., Vollset, S.E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Alahdab, F., and Asgedom, S.W. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* *18*, 88-106.
48. Nikolakopoulou, A.M., Wang, Y., Ma, Q., Sagare, A.P., Montagne, A., Huuskonen, M.T., Rege, S.V., Kisler, K., Dai, Z., Körbelin, J., Herz, J., Zhao, Z., and Zlokovic, B.V. (2021). Endothelial LRP1 protects against neurodegeneration by blocking cyclophilin A. *The Journal of experimental medicine* *218*, e20202207.
49. Novak, P., Kovacech, B., Katina, S., Schmidt, R., Scheltens, P., Kontsekova, E., Ropele, S., Fialova, L., Kramberger, M., and Paulenka-Ivanovova, N. (2021). ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nature Aging* *1*, 521-534.
50. Paudel, Y.N., Angelopoulou, E., Piperi, C., Othman, I., Aamir, K., and Shaikh, M.F. (2020). Impact of HMGB1, RAGE, and TLR4 in Alzheimer's Disease (AD): From Risk Factors to Therapeutic Targeting. *Cells* *9*, 383.
51. Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature reviews Drug discovery* *14*, 183-202.
52. Rajewsky, K. (2019). The advent and rise of monoclonal antibodies. *Nature* *575*, 47-49.
53. Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* *88*, 640-651.

54. Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., Wenger, M., and Maloney, D.G. (2017). Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Advances in therapy* *34*, 2232-2273.
55. Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* *8*, 595-608.
56. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* *1*, a006189.
57. Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., and Selkoe, D.J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* *14*, 837-842.
58. Shaw, J.L., and Diamandis, E.P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clinical chemistry* *53*, 1423-1432.
59. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., and Zlokovic, B.V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* *106*, 1489-1499.
60. Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Fahnestock, M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* *12*, 2747-2751.
61. Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V., and Phelps, C.H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* *7*, 280-292.
62. Storck, S.E., Meist Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J.N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R.E., Bouter, Y., Prikulis, I., Korth, C., Weggen, S., Heimann, A., Schwaninger, M., Bayer, T.A., and Pietrzik, C.U. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* *126*, 123-136.
63. Sweeney, M.D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A.W., and Zlokovic, B.V. (2018a). The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nature neuroscience* *21*, 1318-1331.
64. Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2018b). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* *14*, 133-150.

65. Sweeney, M.D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A.R., and Zlokovic, B.V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological reviews* *99*, 21-78.
66. Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse Hippokampus in vivo. *J Physiol* *570*, 541-551.
67. Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., and Shiosaka, S. (2012). Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J Neurosci* *32*, 12657-12672.
68. Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., and de Leon, M.J. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* *11*, 457-470.
69. Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., von Arnim, C., Reetz, K., Stang, A., Jockel, K.H., Wiltfang, J., Esselmann, H., Otto, M., Tumani, H., Herring, A., and Keyvani, K. (2020). CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *91*, 40-48.
70. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 7735-7738.
71. Thomsen, M.S., Routhe, L.J., and Moos, T. (2017). The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab* *37*, 3300-3317.
72. Tolar, M., Abushakra, S., and Sabbagh, M. (2020). The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers Dement* *16*, 1553-1560.
73. Vogelgsang, S., Warzok, R.W., Cascorbi, I., Kunert-Keil, C., Schroeder, E., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Walker, L.C., and Pahnke, J. (2004). The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* *1*, 121-125.
74. Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535-539.
75. Walsh, S., Merrick, R., Milne, R., and Brayne, C. (2021). Aducanumab for Alzheimer's disease? *Bmj* *374*, n1682.

76. Wan, W., Cao, L., Liu, L., Zhang, C., Kalionis, B., Tai, X., Li, Y., and Xia, S. (2015). A $\beta$ (1-42) oligomer-induced leakage in an in vitro blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *J Neurochem* 134, 382-393.
77. Xing, S., Pan, N., Xu, W., Zhang, J., Li, J., Dang, C., Liu, G., Pei, Z., and Zeng, J. (2019). EphrinB2 activation enhances angiogenesis, reduces amyloid- $\beta$  deposits and secondary damage in thalamus at the early stage after cortical infarction in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 1776-1789.
78. Young, E.J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S.J., Bechard, A.R., Chambers, J., Mount, H.T., Fletcher, P.J., Roder, J.C., and Osborne, L.R. (2008). Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in *Gtf2ird1*-targeted mice. *Genes Brain Behav* 7, 224-234.

## 9 TABELLARISCHER ANHANG

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Erhöhung der Gefäßdichte im Hippokampus durch den <i>mKlk8-Knockdown</i> in transgenen Mäusen. ....	49
Abbildung 2 Kein Einfluss des <i>mKlk8-Knockdowns</i> auf die Gefäßdichte im Neokortex und den Basalganglien. ....	51
Abbildung 3 Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters MDR1 im Neokortex transgener Mäuse. ....	53
Abbildung 4 Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht die Expression des A $\beta$ -Effluxtransporters LRP1 im Neokortex transgener Weibchen. ....	55
Abbildung 5 Der <i>mKlk8-Knockdown</i> reduziert die neokortikale Expression des A $\beta$ -Influxtransporters RAGE in transgenen Weibchen. ....	57

### 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mäuse .....	27
Tabelle 2: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Immunhistochemie .....	32
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Lowry .....	36
Tabelle 4: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits Fluoreszenzgel .....	37
Tabelle 5: Primärantikörper Western Blot .....	41
Tabelle 6: Sekundärantikörper Western Blot .....	41
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen/Kits .....	41
Tabelle 8: Lösungen und Puffer .....	42
Tabelle 9: Chemikalien .....	44
Tabelle 10: Geräte und Programme .....	45

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCA7	Englisch: <i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7</i>
AD	Englisch: <i>Alzheimer`s disease</i>
AK	Antikörper
ANOVA	Englisch: <i>Analysis of Variance</i>
APOE	Apolipoprotein E
APP	Englisch: <i>Amyloid Precursor Protein</i>
AQP4	Aquaporin-4
Aqua Dest	Aqua destillata
ARC	Englisch: <i>Activity Regulated Cytoskeletal-associated Protein</i>
ATG5	Englisch: <i>Autophagy Protein 5</i>
ATG5-12	Englisch: <i>Autophagy Protein 5-12 Complex</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A $\beta$	Amyloid-beta, Beta-Amyloid
BACE1	Englisch: <i>Beta-Side Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines-Serum-Albumin
CAA	Englisch: <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTF $\beta$	Englisch: <i>C-Terminal Fragment Beta</i>
CypA	Cyclophilin A
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DAMP	Englisch: <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ECL	Englisch: <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EOAD	Englisch: <i>Early-onset Alzheimer's disease</i>
EPHB2	Ephrinrezeptor B2
EPHB2-FL	Englisch: <i>full-length-EPHB2</i>
EPM	Englisch: <i>Elevated-Plus-Maze</i>
FKBP5	Englisch: <i>FK506 Binding Protein-5</i>
FN	Fibronectin
GAP43	Englisch: <i>Growth Associated Protein 43</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hAPP	humanes <i>Amyloid Precursor Protein</i>
HRP	Englisch: <i>Horseradish Peroxidase</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IPAD	intramurale periarterielle Drainage
kDa	Kilodalton
KLK8	Kallikrein-8
Klk8-KO	Kallikrein-8 <i>Knockout</i>
L1CAM	Englisch: <i>Neuronal Cell Adhesion Molecule L1</i>
LOAD	Englisch: <i>Late-onset Alzheimer's disease</i>
LRP1	Englisch: <i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1</i>

LTP	Englisch: <i>Long Term Potentiation</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MCI	Englisch: <i>Mild Cognitive Impairment</i>
MDR1	Englisch: <i>Multidrug Resistance Protein 1B</i>
Min	Minute
mKlk8	murines Kallikrein-8
MMP	Matrix-Metalloproteasen, Magermilchpulver
ms	Millisekunden
mSry	Englisch: <i>Murine Sex Determining Region Y</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NF- $\kappa$ B	Englisch: <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells</i>
NOT	Englisch: <i>Novel Object Recognition Test</i>
NRG1	Neuregulin-1
NVU	Englisch: <i>Neurovascular Unit</i>
OF	Englisch: <i>Open-Field-Test</i>
P90	postnataler Tag 90
PCR	Englisch: <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2
PTGER2	Prostaglandin E Rezeptor 2
Q-Q-Plots	Englisch: <i>Quantile-Quantile Plot</i>
RAGE	Englisch: <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
rpm	Englisch: <i>Revolutions per Minute</i>
SDS	Englisch: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	Englisch: <i>Standard Error of the Mean</i>
SH	Standardhaltung
SPP1	Englisch: <i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
SYP	Synaptophysin
Tab	Tabelle
Tg	transgen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TOMM40	Englisch: <i>Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 40</i>
TREM2	Englisch: <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
TST	Englisch: <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> , auch TBST
VLDLR	Englisch: <i>Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor</i>

## 11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Keyvani dafür, dass Sie meine Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Zudem haben die allzeit fachlich exzellente Betreuung und Fürsorge sowie das große Engagement maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Herring und Frau Dr. Münster für die ausgezeichnete Begleitung des Arbeitsprozesses und die Unterstützung in allen methodischen Belangen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Knoll und Frau Macher für die herzliche und geduldige Einarbeitung im Labor sowie die praktische Unterstützung der Versuche.

Ebenso möchte ich mich bei Sofia Krebs, Gerrit Voß und Nils Grammon für die gemeinsame Zeit im Labor bedanken. Die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung hat die Arbeitsphase im Labor zu einer ganz besonderen Zeit gemacht.

Zudem gilt mein Dank meiner Familie und Freunden, die mich zu jeder Zeit unterstützt und den Rücken freigehalten haben, um die Promotion erfolgreich voranzubringen.

## **12 LEBENSLAUF**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**